

DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN
LIPOLYTISCH WIRKSAMER POLYPEPTIDE
AUS HYPOPHYSEN VOM SCHWEIN UND
VOM MENSCHEN

PETER WEISWEILER

1972

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Schwiegl)

Darstellung und Eigenschaften lipolytisch wirksamer
Polypeptide aus Hypophysen vom Schwein und
vom Menschen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin,
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Peter Weisweiler
aus Kiel

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv.Doiz. Dr.med. P. Schwandt

Korreferent: Prof. Dr.med. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.6.1972



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Priv.Do. Dr. med. P. SCHWANDT in der Zeit
von November 1968 bis Januar 1971
an der I. Medizinischen Klinik der Universität
München (Direktor Prof. Dr. med. H. SCHWIEGK)
durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med.
H. SCHWIEGK danken, der mir die Arbeit in den
Laboratorien der Klinik ermöglichte.

Für die großzügige Überlassung von Humanhypophysen
bin ich Herrn Prof. Dr. med. W. DOERR, Direktor des
Pathologischen Instituts Heidelberg, dankbar.

Für ihre tatkräftige Unterstützung danke ich Herrn
Priv.Do. Dr. med. A. FATEH-MOGHADAM, Herrn
Dr. med. R. LAMERZ, Herrn Dr. med. JAEGER aus dem
Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung,
München, und Herrn Prof. Dr. med. N. ZÖLLNER aus
der Poliklinik, München.

Für die Überlassung des Themas und die vielseitigen
Anregungen bedanke ich mich bei Herrn Priv.Do.
Dr. med. P. SCHWANDT .

I N H A L T

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

- A I Einleitung
- A II Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit
- A III Anmerkung

METHODIK

- B Präparative Methoden
 - B I Säulenchromatographie
 - B II Präparative Elektrophorese auf Karton
 - B III Dialyse
 - B IV Herstellung des lipolytischen Rohextraktes
 - B V Gewinnung von Wachstumshormon aus Schweinehypophysen nach ROOS et al.
- C Analytische Methoden
 - C I Dünnschichtchromatographie
 - C II Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie
 - C III Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel
 - C IV Molekulargewichtsbestimmung
 - C IV 1 Sephadex - Gelfiltration
 - C IV 2 Ultrazentrifuge
 - C V Aminosäurenanalyse
 - C VI Bestimmung von Serumgrößen
 - C VII Proteinbestimmung nach LOWRY et al.
 - C VIII Bestimmung der Salzpeaks der Sephadex G 10 - Chromatographie

- C IX Bestimmung des Absorptionsspektrums im Ultraviolettlichtbereich
- D Immunologische Methoden
- D I Herstellung der Immunseren
- D II Radialer Doppeldiffusionstest und indirekte quantitative Bestimmung der Antikörperkonzentration
- D III Immunelektrophorese
- E Biologische Untersuchungen
- E I Probanden und Versuchstiere
- E II in vivo-Versuche
- E III in vitro-Versuche
- E IV Hemmung der in vivo-Lipolyse durch Immunseren
- E V Biologische Tests und Bezugsquellen von Hypophysenhormonen
- F Statistik

ERGEBNISSE

- G Präparation der lipolytisch aktiven Peptide
- G I Peptid A₁ - säulenchromatographische Weiterverarbeitung des Rohextraktes
- G II Peptid A₂ und Peptid B₁ - Kartonelektrophorese als Vorreinigung des Rohextraktes
- G III Peptid B₂ - kartonelektrophoretische Weiterverarbeitung von Fraktion J₁
- G IV Fraktion J aus Humanhypophysen

- H Physikochemische Eigenschaften und
Reinheitskriterien der lipolytisch
aktiven Peptide
- H I Proteingehalt
- H II Ultraviolettlichtspektrum der lipolytisch
 aktiven Peptide
- H III Dowex 1X2 - Chromatographie
- H IV Dünnschichtchromatographie
- H V Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie
- H VI Acrylamidgelelektrophorese
- H VII Molekulargewicht
- H VII 1 Molekulargewichtsbestimmung durch
 Sephadex - Gelfiltration
- H VII 2 Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge
- H VIII Aminosäureanalysen
- J Immunologie der lipolytisch aktiven Peptide
- J I Untersuchungen mit Immunsereen gegen
 Fraktion J und gegen Peptid A₁
- J II Untersuchungen mit einem Immunsereum gegen TSH
- J III Untersuchungen mit einem Antischweinesereum
- K Untersuchte biologische Wirkungen der
lipolytisch aktiven Peptide
- K I in vivo-Lipolyse beim Kaninchen
- K II Das Verhalten von freien Fettsäuren
 und freiem Glycerin im Serum von Zwergschweinen
- K III in vitro-Lipolyse bei verschiedenen Spezies
- K III 1 Lipolyse mit Bestimmung der freien Fettsäuren
- K III 2 Lipolyse mit Bestimmung des freien Glycerins

- K IV Hemmung der in vivo-Lipolyse beim Kaninchen durch Immunserum
- K V Die lipolytische Wirkung von Fraktion J aus Humanhypophysen beim Kaninchen in vivo und in vitro
- L Abgrenzung der lipolytisch aktiven Peptide gegenüber anderen Hypophysenhormonen
 - L I Biologische Tests
 - L II Physikochemische und immunologische Abgrenzung von ACTH und MSH
 - L III Physikochemische und immunologische Abgrenzung von STH
 - L IV Physikochemische und immunologische Abgrenzung von TSH
 - L IV 1 Auftrennung des Roh-TSH in weitere Unterfraktionen
 - L IV 2 Vergleich der TSH-Fractionen mit den lipolytisch aktiven Peptiden

DISKUSSION

- M Lipotrope Hormone der Hypophyse ?
- N Lipolytische Wirkungen
- O Mögliche Wirkungsweise und Bedeutung der lipolytisch aktiven Peptide
- P Immunologie der lipolytisch aktiven Peptide

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATURVERZEICHNIS

A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AFJS	Immunserum gegen Fraktion J
3',5'-AMP	3',5'-Adenosinmonophosphat
APAS	Immunserum gegen Peptid A ₁
ATSHS	Immunserum gegen Roh-TSH
Boehringer 1	Fa. Boehringer, Marburg, Best.Nr. 1
CAF	Celluloseacetatfolie
Fluka 1	Fa. Fluka, Buchs / Schweiz, Best.Nr. 1
Merck 1	Fa. Merck, Darmstadt, Best.Nr. 1
MG	Molekulargewicht
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
PDE	Phosphodiesterase
r	Korrelationskoeffizient (Weitere statistische Abkürzungen siehe F)
Roh-TSH	Thyreotropes Hormon der Fa. Organon, München
STH	Somatotropes Hormon
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreotropes Hormon
U/min	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge

EINLEITUNG

A I Einleitung

Während die Entdeckung, daß der Fettgewebsstoffwechsel eine wichtige Rolle im Energiehaushalt des Organismus spielt, erst in den letzten 15 Jahren allgemeine Verbreitung gefunden hat, wurde ein Einfluß der Hypophyse auf die Fettmobilisation schon 1925 von COOPE und CHAMBERLAIN (28) vermutet, die bei Ratten nach Gabe von Hypophysenextrakten eine Fettzunahme in der Leber beobachteten. Der Anstieg der Ketonkörper, den BURNS und LING (17) nach Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakten fanden, wiesen in die gleiche Richtung. ANSELMINO und HOFFMANN (2) und MAGISTRIS (95) waren die ersten, die neben einer wachstumsfördernden und gonadotropen Wirkung einen Einfluß der Hypophyse auf den Fettgewebsstoffwechsel postulierten.

Da aber eine Reihe der anerkannten Hypophysenhormone auch eine fettmobilisierende Wirkung hatten, wurde das Vorhandensein eines speziellen lipotropen Hormons bezweifelt. Wegen der lipolytischen Aktivität auch von synthetischem ACTH konnte die Annahme der Kontamination mit einer lipotropen Fraktion nicht aufrecht erhalten werden (115 , 168) .

Mit den modernen Reinigungsmethoden haben mehrere Arbeitsgruppen lipolytisch aktive Polypeptide aus Hypophysen verschiedener Spezies

1931	Anselmino u. Hoffmann	Fettstoffwechselhormon	Schwein, Rind, Schaf	
1949	Payne	Fat Mobilizing Factor	Schwein, Rind, Schaf, Pferd	
1956	Leites et al.	Adiposin	Schwein, Rind, Schaf	
1957	Seifter u. Baeder	Lipid Mobilizer	Schwein	
1960	Rudman et al.	Fraktion H	Schwein, Rind, Schaf	
1961	Lelek et al.	Lipidmobilisierendes Hormon		Mensch
1961	Astwood et al.	Peptid I + II	Schwein	Mensch
1964-67	Li et al.	Fraktion L, γ -LPH, β -LPH	Rind, Schaf	
1965	Ruska u. Chuchlow	Lipotropin	Schwein, Rind, Schaf	
1966	Burns et al.	IRC-1		Mensch
1968	Trygstad	Lipid Mobilizing Factor		Mensch
1968-70	Schwandt et al.	Fraktion H, Peptide A u. B	Schwein	Mensch
1968-69	Graf et al.	β -LPH, γ -LPH	Schwein	Mensch
1969	Straub et al.	LF/2	Schwein	
1970	Rudman et al.	7D6, 7D7	Schwein	

Tab. 1 Bisher dargestellte lipidmobilisierende Substanzen aus Hypophysen. Angabe der Autoren und der Spezies, aus deren Hypophysen diese Substanzen gewonnen wurden.

- Lipotropine - dargestellt

(Tabelle 1 , Lit. 12 , 90 , 25 , 91 , 64 , 65 , 134) . Einige Autoren haben lipidmobilisierende Substanzen auch aus Blutplasma (144 , 145 , 88) und Urin (178 , 22) gewonnen.

In unserer Arbeitsgruppe ist bisher aus dem lipolytisch aktiven Rohextrakt G aus Schweinehypophysen eine über Gelfiltration gereinigte Fraktion H hergestellt worden (141 , 169) . Über CM-Sephadex C 50 wurde die weiter gereinigte Fraktion J₃ erhalten (45) .

Die Existenz zweier lipidmobilisierender Peptide in der Hypophyse wurde erstmals 1961 von ASTWOOD et al. (4) durch Gewinnung von Peptid I und II aus Schweinehypophysen nachgewiesen. In der Folgezeit wurden aus Hypophysen von Schaf (90 , 25) und Schwein (64 , 65 , 126) Lipotropine isoliert, von denen die beiden Lipotropine aus Schafhypophysen in ihrer Struktur aufgeklärt und als von den bekannten Hypophysenhormonen verschieden charakterisiert werden konnten.

Unklar ist noch die biologische Bedeutung der lipidmobilisierenden Peptide. Nach den bisherigen Befunden muß der Hormoncharakter noch als unbewiesen gelten.

A II Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Die Aufgaben der vorliegenden Arbeit waren wie folgt gestellt:

1. sollten lipotrope Polypeptide aus Schweinehypophysen rein dargestellt und mit möglichst vielen Kriterien auf Reinheit geprüft werden.
2. sollte versucht werden, das in der Literatur beschriebene zweite Lipotropin zu isolieren.
3. sollten aus Humanhypophysen nach den gleichen Methoden lipidmobilisierende Peptide dargestellt werden.

A III Anmerkung

Der größte Teil der Untersuchungen ist an Schweinehypophysen durchgeführt worden, da Humanhypophysen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Wenn nicht besonders kenntlich gemacht (Kapitel B IV , G IV , K V) , beziehen sich die Angaben auf die Peptidfraktionen aus Schweinehypophysen.

Vergleichende Untersuchungen zwischen den in der Literatur beschriebenen lipolytisch aktiven Fraktionen fehlen bisher. Wir haben deshalb unsere isolierten Peptide Peptid A bzw. B genannt.

M E T H O D I K *

B Präparative MethodenB I Säulenchromatographie

Apparaturen: LKB 7000 A UltroRac-Fraktionensammler mit
 Uvicord II und Fallbügelschreiber
 (Fa. LKB-Produkte AB, Stockholm),
 Spektralphotometer M 4 Q (Fa. Zeiss,
 Oberkochen),
 Quetschpumpen mit regulierbarem Durchfluß
 (Fa. Heidolph, Schwabach),
 Potentiometer E 187 (Fa. Metrohm, Herisau,
 Schweiz),
 Leitfähigkeitsmesser LFG 20 (Fa. Püsl,
 München),
 Glassäulen, Maß nach Angabe, Fritte G 2
 (Fa. Neumann, München),
 Magnetrührer (Fa. Cenco, Breda, Niederlan-
 de).

Für den Großteil der Untersuchungen kommen Dextran-
 der Fa. Sephadex, Uppsala, Schweden zur Anwendung (42) .

* Soweit keine Firmenangaben gemacht worden sind, wurden
 die Materialien von der Apotheke der Universitätsklini-
 ken, München hergestellt.

Als Anionenaustauscher nehmen wir das Kunstharzgel Dowex 1X2 der Firma Serva, Heidelberg (42) . Die Extinktion der Proteine wird bei 278 nm gegen Aqua bidest. bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

Im folgenden wird die allgemeine Durchführung der angewandten säulenchromatographischen Methoden angegeben, während Auftragsmengen und Chromatogramme bei den einzelnen Fraktionen im Ergebnisteil beschrieben sind.

B I 1 CM-Sephadex C 25 - Chromatographie

Materialien: Carboxymethyldextrangel CM-Sephadex C 25 ,
 0,01 M ortho-Phosphorsäure ,
 0,1 M wässrige AgNO_3 -Lösung (Merck 9081) ,
 0,5 M HCl ,
 0,5 M NaOH ,
 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 ,
 0,3 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 .

B I 1.1 Ca. 40 g Trockenpulver quellen über Nacht in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (Verhältniss Gel : Puffer 1 : 10) . Um eine Voralterung des Gels zu erreichen, wird es wie gebrauchtes Gel weiterverarbeitet.

Gebrauchtes Gel wird in einer Nutsche gesammelt und wie folgt regeneriert: Nacheinander wird gewaschen mit
 600 ml HCl - 6 l Aqua bidest. - 600 ml NaOH -
 6 l Aqua bidest. - 3 l 0,01 M Natriumphosphatpuffer
 (Gel von 5 Säulen 39 cm x 2,2 cm) .

Der Nachweis, daß sich kein Cl^- mehr im Eluat befindet,

wird mit 1 ml AgNO_3 -Lösung pro ml geführt.

Das so regenerierte Gel wird in Bechergläsern gesammelt, pH und Molarität (mit Hilfe der Leitfähigkeit) kontrolliert und der pH-Wert, falls erforderlich, genau auf pH 5,8 mit 0,01 M ortho-Phosphorsäure eingestellt. Vor dem Füllen der Säulen wird das Gel an der Wasserstrahlpumpe entgast.

B I 1.2 Vor der Chromatographie wird die Säule

(39 cm x 2,2 cm) 3 Stunden lang mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer^s äquilibriert, und die Elution nach Auftragen der Fraktion mit kontinuierlichem Gradienten wie folgt durchgeführt (151 , 80) :

Zwei Glaskolben mit je 200 ml 0,01 M - 1 - und 0,3 M Natriumphosphatpuffer - 2 - sind durch ein U-Rohr verbunden. Ein Magnetrührer sorgt für eine homogene Ionenkonzentrations- und pH-Zunahme in Kolben 1, der mit der Säule in Verbindung steht. Bei einem Durchfluß von 140 ml/h (Sammelfraktionen 3,6 ml, Sammlung von 100 Gläschen) dauert ein Säulenlauf 3,5 Stunden. Die pH-Änderung wird potentiometrisch, die Ionenkonzentrationsänderung mit Hilfe der Leitfähigkeit (Einheit x 0,01 Siemens) gemessen.

B I 2 Sephadex - Gelfiltration

Materialien:	Sephadex G 10	für MG bis 700 ,
	Sephadex G 25	bis 1500,
	Sephadex G 50 fine	1500 bis 30000 ,
	Sephadex G 50 superfine	-"- ,

Sephadex G 75 3000 bis 70000,
 Sephadex G 100 4000 bis 150000,
 Sephadex G 200 5000 bis 800000,
 0,1 M Essigsäure,
 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4 ,
 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,6 .

10 bis 50 g Trockenpulver quellen über Nacht in Puffer bzw. Wasser (1 : 10) , wobei die Flüssigkeit mehrmals gewechselt wird (114) .

B I 2.1 Sephadex G 25 bis G 200

Nach Äquilibrieren der Säule (39 cm x 2,2 cm) und Auftragen der Fraktion wird unter folgenden Bedingungen chromatographiert (113) : Elution mit Essigsäure bzw. Puffer, Durchflußrate 25 ml/h (Kaliumphosphatpuffer) bzw. 80 ml/h (Essigsäure und Ammoniumbikarbonatpuffer), Sammelfraktionen 3 bzw. 4,5 ml , 60 Gläschen.

B I 2.2 Sephadex G 10 zum Entsalzen

Nach reichlichem Durchspülen mit Aqua bidest. wird bei einem Durchfluß von 80 ml/h und 3 ml - Sammelfraktionen (40 Gläschen) chromatographiert (Säule 39 cm x 2,2 cm). Die Salzpeaks werden wie unten angegeben (C VIII) bestimmt.

B I 3 Dowex 1X2 - Chromatographie

Materialien: Dowex 1X2, Gegenion Cl^- ,
 0,5 N NaOH ,
 0,02 M , 0,05 M , 0,1 M , 1 M Essigsäure .

B I 3.1 Ca. 40 g Trockenpulver quellen über Nacht
 in Aqua bidest. (1 : 10) . Nacheinander
 wird in der Nutsche gewaschen mit

1 l NaOH - 5 l Aqua bidest. - 3 l 0,02 M Essigsäure.

Überprüfung der Molarität wie in B I 1.1 . Die Regene=
 ration erfolgt ebenfalls durch Waschen mit NaOH, Wasser
 und Essigsäure.

B I 3.2 Nach dreistündiger Äquilibrierung mit 0,02 M
 Essigsäure und Auftragen der Fraktion wird
 die Elution im diskontinuierlichen Gradienten mit
 0,05 M / 0,1 M / 1 M bzw. mit 0,05 M / 1 M Essigsäure
 durchgeführt: Säulenabmessungen 36 cm x 1,6 cm , Durch=
 flußrate 80 ml/h , Sammelfraktionen 3,6 ml , 100 Gläschen
 bei einer Laufdauer von 6 Stunden. Die Ionenkonzentrations=
 änderung wird mit Hilfe der Leitfähigkeit (Einheit
 x 0,01 Siemens) gemessen.

Den Einfluß der Durchflußrate auf die Trenneigenschaften
 untersuchten wir in mehreren Testchromatogrammen. Während
 zunächst mit langsamen Pumpengeschwindigkeiten gearbeitet
 wurde, steigerten wir diese später auf mehr als das Zehnfache,
 ohne eine Veränderung der Chromatogramme zu erhalten.

B II Präparative Elektrophorese auf Karton

Apparaturen und Materialien:

Elektrophoresekammer aus Kunststoff,
 66 cm x 45 cm (Fa. Bender & Hobein, München),
 Mehrzwecknetzgerät (Fa. Hirschmann, München),
 Karton 866 (Fa. Machery & Nagel, Düren),
 Mechanische Presse (Fa. Weber, Stuttgart-Uhlbach),

Stammpuffer nach MICHAELIS (pH 8,6 ,
 Ionenstärke 0,1 /_l) :

Natriumbarbital (Merck 6318)	29,43	g
Natriumacetat (Merck 6268)	19,43	g
0,1 M HCl	180	ml
Aqua bidest.	ad	3000 ml .

Die elektrophoretische Trennung erfolgt in
 1 : 1 (v/v) mit Aqua bidest. verdünntem
 Stammpuffer.

Für den Abklatsch wird Whatmanpapier 1
 verwandt.

Färbelösung: 5 g Amidoschwarz 10 B (Merck
 1167) in 1 l Eisessig (Merck 90062) /
 Methanol (Merck 6009) 1 : 9 v/v ,
 Differenzierung mit Eisessig / Methanol
 1:: 9 v/v .

a

Die präparative Elektrophorese mit Kartonmaterial als
 Trägermaterial wird nach der von KNEDEL und SPERL (81)

angegebenen Methode durchgeführt. Pro Karton werden 1 ml der 20 %igen in Trennpuffer gelösten Fraktion aufgetragen. Elektrophoresebedingungen: 16 Stunden bei 200 Volt und 50 milli-Ampère. Nach dem gefärbten Abklatsch des Kartons werden die Zonen durch scharfen Schnitt voneinander getrennt und mit der Presse exprimiert.

B III Dialyse

Materialien: Magnetrührer (Fa. Cenco, Breda, Niederlande) ,
Cellophan-Dialysierschlauch Kal. 18, Porengröße 25 bis 80 Å, Durchlässigkeitsgrenze bei einem MG von 5000 (Fa. Kalle AG, Wiesbaden) .

Die Protein - Salz - Lösungen werden bei 4 ° C gegen Aqua bidest. 36 Stunden (Rohfraktion G 12 Stunden) dialysiert, wobei ein Magnetrührer für eine ausreichende Wasserumwälzung sorgt. Wasserwechsel in Abständen von 6 bis 8 Stunden.

B IV Herstellung des lipolytisch aktiven Rohextraktes

Apparaturen und Materialien:

Hochtourige Kühlzentrifuge Universal Rapid
mit Stahlrotor, 6 x 70 ml
(Fa. Christ, Osterrode) * ,
Potentiometer E 187 (Fa. Metrohm, Herisau,
Schweiz) ,
Mixgerät StarMix (Fa. Electrostar, Berlin) ,
Laborrührer Typ RZR (Fa. Heidolph, Schwabach) ,
Gefriertrocknungsanlage "Delta"
(Fa. Christ, Osterrode) * ,
1 M NaOH ,
1 M HCl ,
Aceton (Merck 14) .

B IV 1 Hypophysen

B IV 1.1 Schweinehypophysen

Die Hypophysen werden den Schweinen (Schlachthof München)
unmittelbar nach dem Schlachten entnommen und sofort
weiterverarbeitet oder auf - 18 ° C eingefroren.

Nach Waschen mit 0,9 %iger Kochsalzlösung werden die
Hypophysen lyophilisiert und bis zur Verwendung in der

* : Zur Abzentrifugation unlöslicher Bestandteile bzw.
zur Gefriertrocknung der in den Ergebnissen beschriebenen
Eiweißfraktionen werden diese Apparate ebenfalls verwendet.

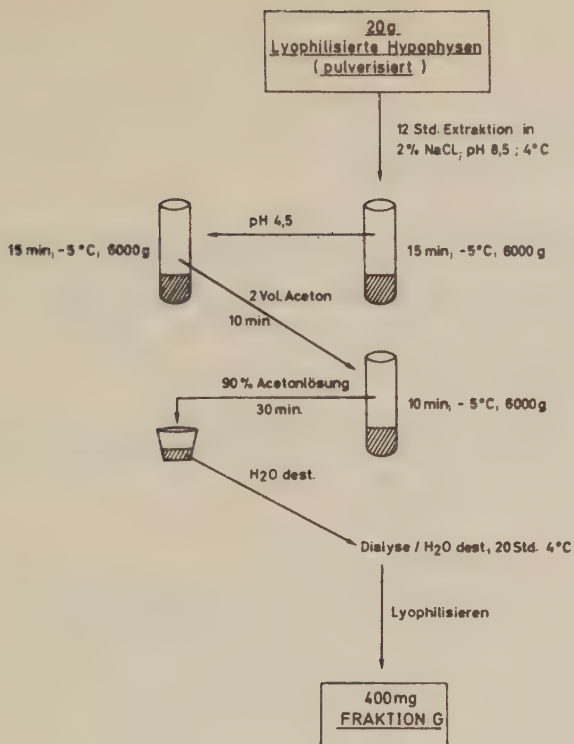


Abb. 1 Schema der Extraktion der Rohfraktion G

Tiefkühltruhe verwahrt.

B IV 1.2 Humanhypophysen

Humanhypophysen erhielten wir vom Pathologischen Institut, Heidelberg, in einem DEWAR-Gefäß tiefgefroren zugesandt. Weiterverarbeitung wie in B IV 1.1 .

B IV 2 Extraktion des lipolytisch aktiven Rohextraktes G aus Hypophysen (Abb. 1)

Nach den Angaben von BONSNES und WHITE (14) und RUDMAN et al. (132 , 131 , 130) führen wir die Extraktion mit der Modifikation aus, daß wir die Acetonfällung in zwei Schritten vornehmen und bei der Verarbeitung der Schweinehypophysen auf die letzte Zentrifugation verzichten, weil bei längerem Rühren die Rohfraktion G vollständig extrahiert wird.

B IV 2.1 Schwein

20 g gefriergetrocknete Hypophysen werden mit dem Mixgerät pulverisiert, in 500 ml 2 %iger Kochsalzlösung suspendiert, die Suspension wird mit 1 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt, über Nacht (12 Stunden) bei 4 ° C gerührt und der pH nachgestellt. Ausgefällene Bestandteile werden bei 8000 g 15 Minuten lang abzentrifugiert.

Der Überstand wird nach Ansäuern mit 0,4 M HCl auf pH 4,5 erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Der Überstand wird mit 2 Volumen Aceton versetzt und nach Rühren (10 Minuten, 0 ° C) bei 8000 g 10 Minuten lang zentrifugiert.

Aus diesem Überstand wird eine 90 %ige Acetonlösung hergestellt, aus der nach 30 Minuten Rühren der Extrakt G ausfällt. Der Überstand wird abgegossen und die Fraktion nach völliger Verdunstung des Acetons in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Dialyse (12 Stunden) und Gefriertrocknung.

B IV 2.2 Mensch

Die Präparation erfolgt in den ersten drei Punkten wie oben. Die 90 %ige Acetonlösung wird nach dem Rühren zusätzlich bei 8000 g 10 Minuten lang zentrifugiert.

B IV 3 Weiterverarbeitung der lyophilisierten Rohfraktion

Für die Reinigung auf CM-Sephadex C 25 wird die lyophilisierte Fraktion G zu 200 mg pro Säule abgewogen, in 4 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 , gelöst und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile bei 8000 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Die klare gelbe Lösung wird eingefroren verwahrt.

Für die Auftrennung auf Karton werden 1 g Fraktion in 5 ml Trennpuffer gelöst (20 %) und zentrifugiert. Auftrag pro Karton: 1 ml .

B V Präparation von STH aus Schweinehypophysen nach
ROOS et al. (120)

Apparaturen und Materialien:

Kühlzentrifuge, Potentiometer, Laborrührer und
 Gefriertrocknungsanlage wie in B IV ,
 POTTER-ELVEJHEM-Gefäß mit Teflonstempel
 (Volumen 30 ml) und Motor (Fa. Braun,
 Melsungen),
 0,03 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,2 ,
 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,6 ,
 0,1 M NaOH ,
 gesättigte (4 ° C) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Lösung
 (Merck 1217) .

Die tiefgefrorenen Hypophysen werden für 2 Minuten in Natrium-
 phosphatpuffer homogenisiert (5 ml/g). Nach einstündigem
 Rühren werden die unlöslichen Bestandteile bei 16000 g
 10 Minuten lang abzentrifugiert. Es erfolgt eine Reextraktion
 des Niederschlages einmal in $\frac{1}{4}$, zweimal in $\frac{1}{8}$ des Puffer-
 originalvolumens. Die Überstände werden vereinigt und mit
 0,1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Dann wird ein gleiches Volumen des bei 4 ° C gesättigten
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter Rühren zugegeben und 1 Stunde weitergerührt.
 Nach Zentrifugation wie oben wird das Präzipitat gesammelt,
 in Wasser aufgeschwemmt, über Nacht dialysiert (12 Stunden)
 und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird mit Kaliumphosphatpuffer (1 : 5 ver-
 dünnt) extrahiert und von unlöslichen Bestandteilen

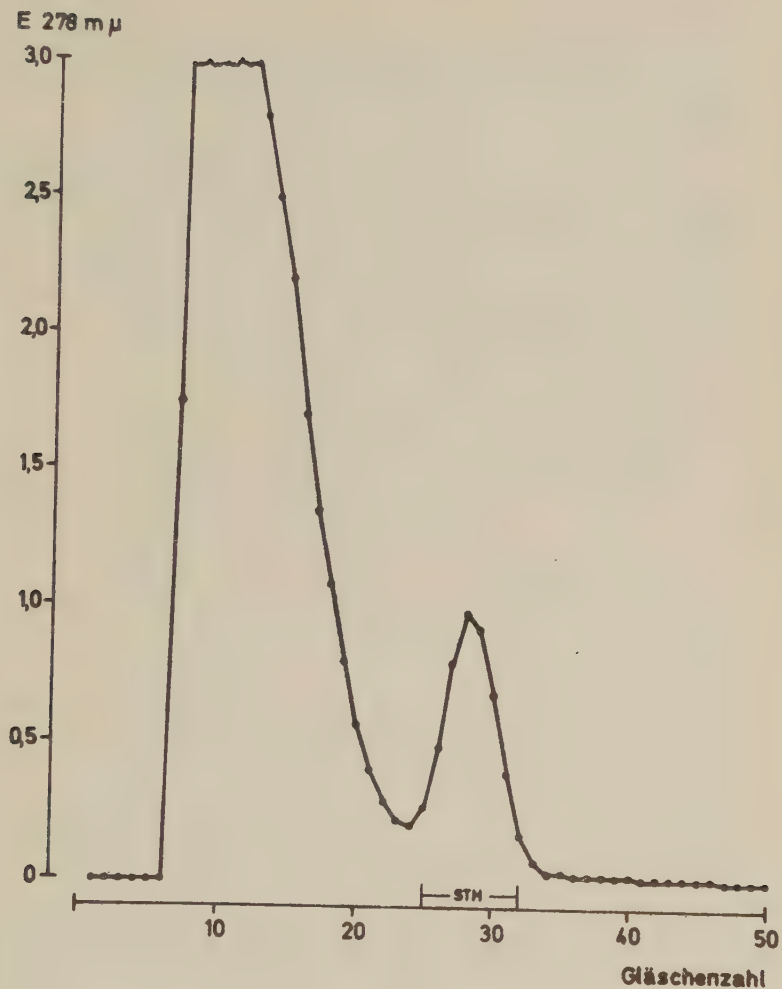


Abb. 2 Säulenchromatogramm von 300 mg STH-Rohextrakt auf Sephadex G 100 (39 x 2,2 cm , 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,6). Sammelfraktionen 4,5 ml, Durchflußrate 25 ml/h. Extinktion 278 nm — .

abzentrifugiert (8000 g, 15 Minuten). Gefriertrocknung.
300 mg des gewonnenen STH-Rohextraktes werden in 5 ml Puffer gelöst und auf einer Sephadex G 100 - Säule chromatographiert: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,6 , Sammelfraktionen 4,5 ml, Durchflußrate 25 ml/h . Gesammelt werden Glas 25 bis 32, Maximum bei Glas 28 (Abb. 2).
Entsalzung durch Dialyse (36 Stunden). Ausbeute 10 mg / g gefrorene Hypophysen.

C Analytische Methoden

C I Dünnschichtchromatographie

Apparaturen und Materialien:

Laufmittelkammer, quaderförmig 21 cm x 21 cm
 x 10 cm (Fa. Neumann, München),
 DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄, 5 cm x 20 cm,
 Schichtdicke 0,25 mm (Merck 5714/0100),
 capillary pipets (Fa. Hyland, Los Angeles, USA),
 Butanol(1) (Merck 1990),
 Eisessig (Merck 90062),
 Amylalkohol (Merck 975),
 Pyridin (Merck 9728),
 d,l-Alanin (Merck 963),
 0,1 M HCl ,
 Ninhydrin Sprühreagenz 0,1 % (Merck 6758/0001),
 Kupfernitrat (Merck 2753),
 Cadmiumchlorid (Merck 2011),
 Kobaltchlorid (Merck 2539).

C I 1 Auftragen der Proben und Anfärben

100 bis 500 µg Substanz werden in 0,05 ml Aqua bidest.
 gelöst und mit einer selbst angefertigten Kapillarpipette
 (hergestellt aus den capillary pipets, die über einem
 Bunsenbrenner mit einer Auslaufspitze versehen werden)
 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt auf 6 Punkte verteilt
 aufgetragen, sowie als Referenz d,l-Alanin (0,1 %ig in

0,1 M HCl) auf jeder Platte (154 , 110) .

Bei der Herausnahme der Platten aus der Kammer werden die Laufmittelfronten markiert, nach Verdunsten des Laufmittels die Platten mit dem Sprühreagenz eben angefeuchtet und nach kurzem Vortrocknen bei 100 ° C 15 Minuten lang in einen Trockenschrank gelegt. Die Ninhydrinfarbe wird mit einem der unten angegebenen Reagentien stabilisiert, was gleichzeitig eine Farbvertiefung zur Folge hat.

Zur Stabilisierung der Ninhydrinfarbe werden die bei CLOTTEN und CLOTTEN (27) angegebenen Sprühreagentien aus Kupfernitrat (185) , Cadmiumchlorid (76) , Kobaltchlorid (103) angewendet. Am brauchbarsten erweisen sich die Ninhydrin-Cu - und -Cd - Verbindungen, während sich beim Kobalt eine Rotfärbung des Untergrundes nicht verhindern läßt.

C I 2 Laufmittelsysteme

Als mobile Phasen nehmen wir ein stark saures, ein schwach saures und ein alkalisches System:

System 1 : Butanol(1) - Eisessig - Wasser

1 : 1 : 1

pH 2,1 Laufzeit 2,5 Stunden ,

System 2 : Butanol(1) - Eisessig - Wasser - Pyridin

60 : 6 : 24 : 20

pH 5,1 Laufzeit 3 Stunden ,

System 3 : Amylalkohol - Pyridin - Wasser

35 : 35 : 30

pH 9,1 Laufzeit 3 Stunden.

C II Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie

Apparaturen und Materialien:

Elektrophoresekammer und Netzgerät Pherostat

(Fa. Boskamp, Hersel),

Membranfolien Nr. 1501, 25,5 mm x 145 mm

(Fa. Sartorius-Membranfiltergesellschaft,
Göttingen),

Sample Applicator Nr. 324399 (Fa. Beckman,
München),

Puffer, Färbelösung, Lösung zum Differenzieren
wie in B II ,

Transparenzlösung: Dioxan / Isobutanol

(Merck 3111) 7 : 3 v/v .

0,05 ml der in 0,9 %iger Kochsalzlösung gelösten Probe
(Konzentration 4 bis 20 g/100 ml) werden mit dem Sample
Applicator aufgetragen. Die Trennungszeit beträgt 25
Minuten bei 200 Volt und 1 milliAmpère/cm.

Färbung, Differenzierung und Herstellen der Transparenz wird
nach Firmenvorschrift vorgenommen (46).

C III Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Apparaturen und Materialien:

Acrylamidgel-Säulenelektrophorese-Gerät
 "Acrylophor" (Fa. Pleuger, Belgien) ,
 Netzgerät (Fa. Shandon, Frankfurt) ,
 Elektrophoreseröhrchen, 70 mm Länge, 5 mm
 Innendurchmesser (Fa. Shandon, Frankfurt) ,
 Fluoreszenzlampe 20 Watt (Fa. Trilux, München) ,
 Rekord-Glasspritze mit Bajonettverschraubung,
 10 ml ,
 Spezialkanüle, Nr. FR 1230 NR G 23 2
 (Fa. Becton, Dickinson, Frankreich) ,
 Stammlösungen:

<u>A</u>	1 M KOH	48	ml
	Eisessig (Merck 90062)	17,2	ml
	N,N,N',N' -Tetramethyläthylendiamin (Fluka 87690)	4	ml
	Aqua bidest.	ad 100	ml
<u>B</u>	1 M KOH	48	ml
	Eisessig (Merck 90062)	2,87	ml
	N,N,N',N' -Tetramethyläthylendiamin (Fluka 87690)	0,46	ml
	Aqua bidest.	ad 100	ml
<u>C</u>	Acrylamid (Fluka 01700)	60	g
	N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Fluka 66670)	0,4	g
	Aqua bidest.	ad 100	ml

<u>D</u>	Acrylamid (Fluka 01700)	10	g
	N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Fluka 66670)	2,5	g
	Aqua bidest. ad	100	ml
<u>E</u>	Riboflavin (Fluka 95170)	4	mg
	Aqua bidest. ad	100	ml
Puffer (pH 4,5): beta-Alanin			
	(Fluka 05160)	31,2	mg
	Eisessig		
	(Merck 90062)	8	ml
	Aqua bidest.		
	ad	1000	ml

Arbeitslösungen, die kurz vor dem Gießen der Säulen angesetzt werden:

1.) Kleinporige Gellösung, pH 4,3

A / C / Aqua bidest. 1 : 2 : 1.,
dazu das gleiche Volumen einer frisch
angesetzten Ammoniumperoxodisulfatlösung
(Merck 1201, 0,28 g/100 ml) ;
Acrylamidkonzentration 15 %.

2.) Großporige Gellösung, pH 6,8

B / D / E / Aqua bidest. 1 : 2 : 1 : 4 ;
Acrylamidkonzentration 2,5 %.

Färbelösung: 0,5 % Amidoschwarz 10 B (Merck
1167) in 7 %iger Essigsäure ,

Entfärbelösung: 7 %ige Essigsäure .

nen Methode (97) .

1. Trenngel: Auf einer Platte mit einer Lage Knetmasse werden die Röhren aufrecht eingesteckt. 1,6 ml Lösung 1.) werden mit Glasspritze und Spezialkanüle vorsichtig eingefüllt und mit 0,1 ml Wasser überschichtet.

2. Sammelgel: Nach dreißigminütiger Polymerisation bei Tageslicht wird das überstehende Wasser abgesaugt, die Geloberfläche mit Lösung 2.) abgespült, von der dann 0,15 ml aufgeschichtet werden. Für 15 Minuten wird bei fluoreszierendem Licht polymerisiert, wobei das Tageslicht abgeschirmt wird.

3. Substanzgel: Nach Entfernung des überstehenden Wassers wird eine Mischung von 0,005 ml Probe (120 bis 300 μ g Substanz) und 0,1 ml Lösung 2.) aufgetragen und 20 Minuten lang bei fluoreszierendem Licht polymerisiert.

Elektrophoresebedingungen: 1 Stunde Trenndauer, 80 Volt, 5 bis 6 milliAmpère pro Röhren.

Nach einstündigem Färben werden die Gelsäulen in 7 %ige Essigsäure gelegt. Bei häufigem Essigsäurewechsel wird eine gute Entfärbung des Untergrundes in 36 Stunden erzielt.

Das Überschichten mit Wasser beim Gießen des Sammelgels haben wir fallengelassen, da sich nach unseren Erfahrungen dadurch die Polymerisation unnötig in die Länge zieht.

C IV Molekulargewichtsbestimmung

C IV 1 Sephadex - Gelfiltration

Eine orientierende Bestimmung der Molekulargewichte der **lipotropen Peptide** wird mittels Gelfiltration auf Sephadex G 50 - Säulen (39 cm x 2,2 cm) in Anlehnung an die von SANFELIPPO und SURAK (135) angegebenen Methode durchgeführt (Chromatographiebedingungen siehe B I 2).

Als Referenziweiße dienen

Hämoglobin vom Rind (2 x krist, reinst, Fa. Serva, Heidelberg),

Insulin (cryst., Fa. Fluka, Buchs, Schweiz),

ACTH vom Schwein (Fa. Schering, Berlin).

Die Grundlage der Berechnung ist die lineare Beziehung zwischen dem Parameter K_D (der proportional dem Elutionsvolumen der einzelnen Eiweiße ist) und dem rezipoken Wert des Logarithmus des Molekulargewichtes:

$$K_D = A \frac{1}{\log MG} + B, \text{ mit } K_D = \frac{V_{El} - V_O}{V_i},$$

wobei V_{El} das Elutionsvolumen,

V_O das Volumen der mobilen Phase,

V_i das innere Volumen, d.h.

$$V_i = \frac{w_R d}{1 - w_R} (V_t - V_O)$$

(w_R = "water regain", d = Dichte, V_t = Totalvolumen der Säule) ist.

Experimentell ergeben sich folgende Daten:

$$V_t = 123 \text{ ml} ,$$

$$V_o = V_{\text{El Hämoglobin}} = 51 \text{ ml} , K_D \text{ Hämoglobin} = 0 ,$$

$W_R = 5 \text{ ml/g}$, da pro Säule 10,4 g Sephadex G 50 fine verwendet, insgesamt 52 ml ,

$$d = 1,06 \text{ g/ml} ,$$

$$V_i = 68,6 \text{ ml} ,$$

$$V_{\text{El ACTH}} = 87 \text{ ml} , K_D \text{ ACTH} = 0,5248 ,$$

$$V_{\text{El Insulin}} = 81 \text{ ml} , K_D \text{ Insulin} = 0,4519 ,$$

für $1/\log \text{ MG}$ ergibt sich bei

$$\text{Hämoglobin (MG 68000) } 0,2069 ,$$

$$\text{Insulin (MG 6000) } 0,2647 ,$$

$$\text{ACTH (MG 4560) } 0,2733 .$$

Aus den errechneten Werten für K_D und $1/\log \text{ MG}$ wird die Regressionsfunktion berechnet:

$$K_D = 7,781 \cdot 1/\log \text{ MG} - 1,609 \quad (r = 0,999) .$$

Das Molekulargewicht der Lipotropine wird anhand dieser Funktion aus den K_D -Werten bestimmt. Fehlergrenze $\pm 10 \%$ (135).

C IV 2 Ultrazentrifuge (47)

Apparaturen: Spinco Ultrazentrifuge Model E, analytisch mit Schlierenoptik (Fa. Beckman, München),
UZ-Zellen:
valve-type Zelle mit künstlicher Grenzschicht für die Sedimentationsgeschwindigkeit,

C IV Molekulargewichtsbestimmung

G IV 1 Sephadex - Gelfiltration

Eine orientierende Bestimmung der Molekulargewichte der **lipotropen Peptide** wird mittels Gelfiltration auf Sephadex G 50 - Säulen (39 cm x 2,2 cm) in Anlehnung an die von SANFELIPPO und SURAK (135) angegebenen Methode durchgeführt (Chromatographiebedingungen siehe B I 2).

Als Referenzeiweiße dienen

Hämoglobin vom Rind (2 x krist, reinst, Fa. Serva, Heidelberg),

Insulin (cryst., Fa. Fluka, Buchs, Schweiz),

ACTH vom Schwein (Fa. Schering, Berlin).

Die Grundlage der Berechnung ist die lineare Beziehung zwischen dem Parameter K_D (der proportional dem Elutionsvolumen der einzelnen Eiweiße ist) und dem reziproken Wert des Logarithmus des Molekulargewichtes:

$$K_D = A \frac{1}{\log MG} + B, \text{ mit } K_D = \frac{V_{El} - V_0}{V_i},$$

wobei V_{El} das Elutionsvolumen,

V_0 das Volumen der mobilen Phase,

V_i das innere Volumen, d.h.

$$V_i = \frac{W_R d}{1 - W_R} (V_t - V_0)$$

(W_R = "water regain", d = Dichte, V_t = Totalvolumen der Säule) ist.

Experimentell ergeben sich folgende Daten:

$$V_t = 123 \text{ ml ,}$$

$$V_o = V_{El} \text{ Hämoglobin} = 51 \text{ ml , } K_D \text{ Hämoglobin} = 0 ,$$

$W_R = 5 \text{ ml/g}$, da pro Säule 10,4 g Sephadex G 50 fine verwendet, insgesamt 52 ml ,

$$d = 1,06 \text{ g/ml ,}$$

$$V_i = 68,6 \text{ ml ,}$$

$$V_{El} \text{ ACTH} = 87 \text{ ml , } K_D \text{ ACTH} = 0,5248 ,$$

$$V_{El} \text{ Insulin} = 81 \text{ ml , } K_D \text{ Insulin} = 0,4519 ,$$

für $1/\log \text{ MG}$ ergibt sich bei

$$\text{Hämoglobin (MG 68000) } 0,2069 ,$$

$$\text{Insulin (MG 6000) } 0,2647 ,$$

$$\text{ACTH (MG 4560) } 0,2733 .$$

Aus den errechneten Werten für K_D und $1/\log \text{ MG}$ wird die Regressionsfunktion berechnet:

$$K_D = 7,781 \cdot 1/\log \text{ MG} - 1,609 \quad (r = 0,999) .$$

Das Molekulargewicht der Lipotropine wird anhand dieser Funktion aus den K_D -Werten bestimmt. Fehlergrenze $\pm 10 \%$ (135).

C IV 2 Ultrazentrifuge (47)

Apparaturen: Spinco Ultrazentrifuge Model E, analytisch
mit Schlierenoptik (Fa. Beckman, München),
UZ-Zellen:
valve-type Zelle mit künstlicher Grenzschicht
für die Sedimentationsgeschwindigkeit,

YPHANTIS-Zelle (8 Kanal-Zelle) für das
Sedimentationsgleichgewicht (187),
Mikrokomparator (Fa. Zeiss, Hamburg).

C IV 2.1 Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Wegen der nach der Gelfiltration zu erwartenden niedrigen Sedimentationskoeffizienten werden die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe in der Zelle mittels Überschichtung bei der möglichen Höchstumdrehungszahl (59780 U/min) durchgeführt. Bei der zunächst vorgenommenen $\frac{dn}{dc}$ - Bestimmung (Brechungsindexinkrement für die Molekulargewichtsberechnung, siehe C IV 2.2) werden im Abstand von 2 Minuten in einem Phasenwinkel von 70° sechs Bilder aufgenommen. Bei den unmittelbar sich anschließenden Geschwindigkeitsläufen werden über 90 Minuten (Winkel 70°) Kontrollbilder aufgenommen. Die **Peptide** werden nicht in Puffer, sondern in Aqua bidest. gelöst, um eine gute Substanzwiedergewinnung zu ermöglichen und um Beeinträchtigungen des Maximums durch einen zusätzlichen Salzgradienten zu vermeiden.

Die Auswertung der entwickelten Fotoplatten erfolgt in der Differentialform (rechnerisch). Die Abstände von der Bodenreferenzlinie zum Maximum der Gradientenkurve werden unter einem Mikrokomparator gemessen. Die Bestimmung eines s_c -Wertes (20° C, Wasser) aus den gemessenen r_1 und r_2 sowie die Zeitdifferenz Δt erfolgt nach der Formel

$$s_c = \frac{r_2 - r_1}{\frac{r_1 + r_2}{2} (t_2 - t_1) \omega^2} \cdot 60$$

(r = Abstand Rotationszentrum - Maximum der Gradientenkurve in cm , t = zugehörige Zeit in Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit , ω = Winkelgeschwindigkeit).

Die wahre Verschiebung $\Delta r = r_2 - r_1$ errechnet sich aus dem auf einer Vergrößerung meßbaren Δx über

$$\Delta r = \frac{\Delta x}{m_x E} \quad , \text{ wobei } m_x \text{ der Vergrößerungsfaktor der Kamera=}$$

linse in x-Richtung und E der Vergrößerungsfaktor Vergrößerungsapparat - fotografische Platte ist. Die zugehörige Sedimentationskonstante wird anhand einer Regressionsfunktion berechnet. Die Einheit ist Svedberg = 10^{-13} sec .

C IV 2.2 Bestimmung des Molekulargewichtes

Die Molekulargewichtsbestimmung wird wegen des geringsten Substanzverlustes und befriedigender Genauigkeit im Sedimentationsgleichgewicht bei einer Umdrehungszahl von 12590 U/min durchgeführt. Das Gleichgewicht wird spätestens nach 60 Minuten erreicht.

Nach der allgemeinen Formel

$$MG = \frac{RT}{(1 - v_{s,2} \rho_1) \omega^2} \cdot \frac{dc/dr}{r c}$$

wird mit Hilfe der Schlierenmessung das bei der gewählten Konzentration vorhandene scheinbare Molekulargewicht MG_{app} berechnet nach

$$MG_{app} = \frac{R T}{(1 - V_{s,2}) \omega^2} \cdot \frac{y \operatorname{tg} \theta}{L T_z m_y E \frac{dn}{dc} r c_0}$$

(R = allgemeine Gaskonstante ($8,313 \cdot 10^7$ erg Mol $^{-1}$ Grad $^{-1}$),
 T = absolute Temperatur in $^{\circ}$ Kelvin , r = Abstand Rotations-
 zentrum - Gradientenkurvenmitte, y = gemessene Höhe Basis=
 linie - Gradientenkurve, c_0 = Ausgangskonzentration, ω =
 Winkelgeschwindigkeit, $V_{s,2}$ = partielles, spezifisches Volu=
 men = $1/\rho_2$ (ρ_2 = Dichte der gelösten Substanz) - für $V_{s,2}$
 wird der von LI et al. (90) berechnete Wert von 0,782
 übernommen, ρ_1 = Dichte des Lösungsmittels, θ = ablesbarer
 Schlierenwinkel (70°), L = optischer Hebelarm (Maschinen=
 konstante), T_z = Zelldicke (12 mm), Lichtweg in der Zelle,
 m_y = Vergrößerungsfaktor der Zylinderlinse in y-Richtung,
 E = Vergrößerungsfaktor Vergrößerungsapparat - fotografische
 Platte) .

Das Brechungsindexinkrement $\frac{dn}{dc}$ ($\frac{ml}{g}$) wird berechnet
 nach der Gleichung

$$\frac{dn}{dc} = \frac{\operatorname{tg} \theta A_t}{L T_z m_x m_y E^2 c_0}$$

(A_t = Fläche unter der Gradientenkurve zur Zeit t in cm^2 ,
 m_x = Vergrößerungsfaktor der Kameralinse in x-Richtung).

Folgender Wert ergibt sich: $\frac{dn}{dc} = 0,154$.

Aus den apparenten Molekulargewichten wird über die Regressions=

funktion und Extrapolation auf $c = 0$ das zugehörige Molekulargewicht errechnet. Als kritische Fehlergrenze ist $\pm 5 \%$ angegeben (47) .

C V Aminosäurenanalysen

Die Aminosäurenanalysen wurden im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, durchgeführt.

Nach saurer Hydrolyse (6 M HCl , 110°C) wird der in 0,2 N Natriumcitratpuffer (pH 2,2) gelöste Rückstand über die beiden Ionenaustauschersäulen eines automatischen Aminosäurenanalysators (Fa. Beckman, München, Modell 120 B) analysiert (152) .

Zur Bestimmung des Tryptophans wird vor der Analyse das Peptid mit der von PFLEIDERER et al. (112) beschriebenen Aminopeptidase M hydrolytisch gespalten.

C VI Bestimmung der Serumgrößen

C VI 1 Freie Fettsäuren nach DOLE und MEINERTZ (40)
mit Heptan-gewaschenem Nilblau A (Fluka 72480)
als Indikator. Die dazu eingesetzte Serummenge beträgt 0,5 ml. Als Standard dient ein Gemisch von Palmitin- , Stearin- , Myristin- und Laurinsäure in n-Heptan (Merck 88)
(1 : 1 : 1 : 1 v/v) .

C VI 2 Freies Glycerin enzymatisch nach EGGSTEIN und

und KREUTZ (44).

C VI 3 Gesamteiweiß mit der Biuretmethode (176).

C VII Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (93)

Apparaturen und Materialien:

Photometer Elko III (Fa. Zeiss, Oberkochen),

Reagenz 1:

2 % Na_2CO_3 (Merck 6395) in 0,1 M NaOH und
0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1 %iger di-Natriumtartrat=
lösung (Merck 27 91 und 6664) im Verhältnis
50 : 1 v/v ,

Reagenz 2:

1 N FOLIN-CIOCALTEU-Phenolreagenz (Merck 9001 ,
vor jeder Bestimmung wird die Normalität der
Säure durch Titration mit 1 M NaOH bestimmt, und
die benötigte Menge mit Aqua bidest. auf 1 normal
verdünnt) ,

Rinderalbumin reinst (Fa. Boehringer, Marburg).

Neben der üblichen Biuretmethode wenden wir die 100 mal
empfindlichere Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (93)
an, die neben der Kupferchelatzbildung das Phenolreagenz von
FOLIN und CIOCALTEU (51) verwendet.

C VII 1 Proteinbestimmung

Nacheinander werden in ein Reagenzglas gegeben (Endvolumen 1,2 ml):

0,1 ml Probe, bestehend aus x ml proteinhaltiges Eluat und (0,1 ml - x ml) Wasser; für den Leerwert werden 0,1 ml Wasser eingesetzt. Berechnung des Verdünnungsfaktors D.

1 ml Reagenz 1 . Schütteln und 10 Minuten stehen lassen.

0,1 ml Reagenz 2. Schütteln und 30 Minuten stehen lassen.

Für jeden Wert wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Ablesen der Extinktion bei 550 nm, Schichtdicke 0,5 cm. Die Eichung erfolgt mit Rinderalbumin.

C VII 2 Aufstellen der Eichkurve

Aus den gemessenen Extinktionswerten für jede gewählte Albuminkonzentration wird die Regressionsfunktion berechnet. Eine Linearität der Eichkurve besteht bis zu Konzentrationen von 0,5 mg/ml. Hieraus ergibt sich als Regressionsgerade (x = Eiweißkonzentration, y = Extinktion):

$$y = 0,233 + 1,123 (x - 0,208) \quad (r = 0,996).$$

Daraus berechnen wir die Konzentrationen (bis 0,5 mg/ml) aus der Extinktion bei Vernachlässigung des Faktors $0,001/1,123$ nach

$$x \text{ mg/ml} = 0,891 D E$$

(D = Verdünnungsfaktor, E = Extinktion).

C VIII Bestimmung der Salzpeaks bei der Sephadex G 10 -
Chromatographie

C VIII 1 Ammoniumbikarbonat

Apparaturen und Materialien:

Photometer Elko III (Fa. Zeiss, Oberkochen),
 NESSLER-Reagenz A und B (Merck 9011 und 9012),
 0,002 N H_2SO_4 .

Die Bestimmung des Ammoniums erfolgt nach NESSLER (9).
 Nacheinander werden in ein Reagenzglas gegeben (Endvolumen
 8,35 ml):

0,05 ml Probe,

8 ml 0,002 N H_2SO_4 ,

0,3 ml Gemisch von NESSLER-Reagenz A und B 1 : 1 v/v.

Fünf Minuten stehen lassen.

Beim Leerwert werden 0,05 ml Aqua bidest. an Stelle der Probe
 eingesetzt. Messung bei 436 nm, Schichtdicke 0,5 cm.

C VIII 2 Natriumphosphat

Apparaturen und Materialien:

Spektralphotometer M 4 Q (Fa. Zeiss, Ober-
 kochen),

Farbreagenz:

1 Vol. 4,2 % $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 1182) in
 4,5 M HCl und 3 Vol. 0,2 %ige wässrige Malachit=
 grünlösung (Merck 1398); nach 30 Minuten

Abfiltern der unlöslichen Bestandteile.

Tween 20 1,5 %ig .

Die Bestimmung der Phosphatkonzentration erfolgt nach der von ITAYA und UI (75) angegebenen Methode. Nacheinander werden in ein Reagenzglas gegeben (Endvolumen 5,25 ml):

0,05 ml Probe,

5 ml Farbreagenz,

0,2 ml Tween 20,

fünf Minuten stehen lassen.

Beim Leerwert werden 0,05 ml Aqua bidest. an Stelle der Probe eingesetzt. Messung bei 660 nm, Schichtdicke 1 cm.

C VIII 3 Natriumbarbital

Materialien: DC-Fertigplatten wie in C I ,

Quecksilber(I)-nitrat (Merck 4437).

Das Barbital (Veronal^R) des Elektrophoresepuffers absorbiert das ultraviolette Licht bei 278 nm noch hinreichend. (Maximum im UV-Spektrum zwischen 240 und 250 nm), sodaß der Salzpeak scharf gegenüber dem Proteinpeak abgegrenzt werden kann.

Ein qualitativer Nachweis des Barbituratderivates wird in Form einer Tüpfelreaktion auf Dünnschichtplatten mit einer 1 %igen wässrigen Lösung von HgNO_3 durchgeführt (33).

C VIII 4 Essigsäure

Apparaturen: Potentiometer E 187 (Fa. Metrohm, Herisau,
Schweiz).

Den Essigsäurepeak weisen wir potentiometrisch nach.

C IX Bestimmung des Absorptionsspektrums im
Ultraviolettlichtbereich

Apparatur: Spektralphotometer M 4 Q (Fa. Zeiss, Oberkochen).

Die Extinktion der Eiweißprobe wird gegen Aqua bidest. im
Wellenbereich von 205 bis 300 nm unter folgenden Bedingungen
gemessen: Konzentration 0,25 mg/ml , pH 5,8 ,
Schichtdicke 1 cm.

D Immunologische Methoden (5)

Apparaturen und Materialien:

Albinokaninchen, 3 kg, beiderlei Geschlecht,
 inkomplettes FREUND'sches Adiuvars
 (Fa. Difco Lab., Detroit, USA),
 Feuchte Kammer und Nivelliertisch
 (Fa. Boskamp, Hersel),
 Mehrzwecknetzgerät (Fa. Hirschmann, München),
 Schneideschablone,

Objektträger und Glasplatten (8 cm x 10 cm)
 (Fa. Neumann, München),

Bacto-Agar (Fa. Difco Lab., Detroit, USA),
 Agarlösungen:

1,5 %ig in 0,9 %iger Kochsalzlösung mit
 0,01 % Cialit (Fa. Asid-Institut GmbH, München)
 als Konservierungsmittel für radiale
 Diffusionsteste,

1,5 %ig in Trennpuffer für die Immun=
 elektrophorese,

Trennpuffer wie in B II ,

Färbelösung:

2 g Azokarmin G (Merck 1593) in 1 l
 Eisessig (Merck 90062) / Methanol (Merck
 6009) 1 : 9 v/v ,

Differenzierung mit Eisessig / Methanol

1 : 9 v/v ;

Antischweineserum (Fa. Boehringer, Marburg).

D I Herstellung der Immunseren

Zur Herstellung der Immunseren werden Albinokaninchen wie folgt immunisiert (49) :

0,5 ml Fraktion werden in 1 ml inkomplettem Adjuvans emulgiert. Jeweils 0,25 ml werden den Tieren zwischen die Zehen und intramuskulär in die Oberschenkel der Vorderläufe injiziert. Die Impfung erfolgt in der ersten Woche zweimal, dann wöchentlich einmal.

Vier Wochen nach Beginn der Immunisierung werden die Kaninchenserum auf den Gehalt präzipitierender Antikörper mit dem radialen Doppeldiffusionstest geprüft. Die Kaninchen werden solange weiter immunisiert, bis eine ausreichende Antikörperkonzentration erreicht ist (8 bis 10 Wochen). Die Immunseren werden dann durch Herzpunktion oder Entbluten an der Arteria carotis gewonnen.

D II Radialer Doppeldiffusionstest und indirekte quantitative Bestimmung der Antikörperkonzentration

Beim radialen Doppeldiffusionstest nach CUCHTERLONY (106 , 107) werden Objektträger mit 2,2 ml Agarlösung beschickt. Das zentrale Reservoir hat einen Durchmesser von 6 mm, die peripheren Löcher von 2,5 mm. Der zentrale Abstand zwischen mittleren und peripheren Löchern beträgt 7,5 mm, der der peripheren untereinander 6 mm. Diffusionszeit 8 bis 12 Stunden.

Mit Hilfe der indirekten radialen Diffusion nach FEINBERG (50) wird die Antigenmenge ermittelt, die zur Vollabsorption einer bestimmten Menge Immuns serum benötigt wird. Gleiche Mengen Immuns serum und verschieden verdünnte Antigenlösungen werden vermischt und 45 Minuten stehen gelassen. In drei parallelen Reihen werden aus dem Agar Löcher mit 5 mm Durchmesser mit zentralen Abständen von jeweils 10 mm ausgestanzt. Die oberste Reihe wird mit den gleichen Mengen Antikörper, die unterste mit gleichen Mengen Antigenlösung und die mittlere mit dem Antigen-Antikörper-Gemisch beschickt. Bei etwa äquivalenten Antigen-Antikörper-Verhältnis sind weder unten noch oben Präzipitationslinien nachweisbar.

D III Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wird nach GRABAR und WILLIAMS (63) in der Modifikation von SCHEIDEGGER (137) als Mikroverfahren durchgeführt (elektrophoretische Trennzeit 90 Minuten, 280 Volt, 45 milliAmpère/cm² , Diffusionsdauer in der feuchten Kammer 12 Stunden).

Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen betragen 5 bis 20 g/100 ml.

E Biologische Untersuchungen

E I Probanden und Versuchstiere

Mensch, stoffwechselgesund, kein Carcinom, beiderlei
Geschlecht,
subcutanes Fettgewebe intraoperativ.

Kaninchen, grauscheckig, 3 kg, beiderlei Geschlecht,
perirenales Fettgewebe.

Ratte, Wistar, 250 bis 300 g, männlich,
epididymales Fettgewebe.

Meerschweinchen, bunt, mischrassig, 300 g, männlich,
epididymales Fettgewebe.

Maus, Albino, 35 g, männlich,
epididymales Fettgewebe.

Hausschwein, ca. 100 kg, und Hanford-Miniaturschwein, 40 kg,
beiderlei Geschlecht (31) ,
subcutanes Fettgewebe.

Zur Fettgewebsentnahme werden Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen und Maus durch Schlag in den Nacken getötet. Das Fettgewebe der Schweine erhalten wir vom Schlachthof München unmittelbar nach dem Schlachten der Tiere. Das Fettgewebe von Zwergschweinen wird im Rahmen operativer Eingriffe in allgemeiner Narkose gewonnen.

Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen und Mäuse werden mit Altromin R (Fa. Altrogge, Lage) ad libitum gefüttert. Die Zwergschweine erhalten 800 g/Tag Schweinemastfutter II (Deutsche Landwirtschaftsgenossenschaft) .

E II in vivo - Versuche

0,25 mg in 3 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöste lipolytisch aktive Fraktion wird den Kaninchen subcutan zwischen die Schulterblätter und 0,1 mg/kg in 3 ml gelöste Fraktion den Zwergschweinen intravenös über einen Verweilkatheter (94) injiziert. Die Blutentnahme erfolgt beim Kaninchen über eine Ohrrendvene, wobei auf hämolysefreie Entnahme des Blutes geachtet wird.

E III in vitro - Versuche

Apparaturen und Materialien:

WARBURG-Apparatur (Fa. Braun, Melsungen),
 WARBURG-Gefäße (Fa. Braun, Melsungen),
 Rinderalbumin (reinst, Fa. Behringwerke,
 Marburg),
 KREBS-RINGER-Bikarbonatpuffer, pH 7,4
 bestehend aus: NaCl 106, NaHCO_3 40, KCl 5,4 ,
 CaCl_2 1,0 , KH_2PO_4 1,0 , MgSO_4 1,0 mmol/l ,
 Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2),
 Fettgewebe siehe E I ,
 ACTH vom Schwein (Fa. Schering, Berlin),
 Noradrenalin (Arterenol^R) (Fa. Hoechst,
 Frankfurt).

Die in vitro-Lipolyse wird nach folgender Methode gemessen
 (61 , 184 , 142):

Das Gewebe wird gleich nach dem Töten der Tiere entnommen, in 0,9 %iger Kochsalzlösung gespült und nach kurzem Trocknen auf Filterpapier in Portionen zu 100 mg abgewogen. Die Inkubation erfolgt in WARBURG-Gefäßen, die je 3 ml des albuminhaltigen Puffers enthalten. Das Rinderalbumin, das in einer Konzentration von 3 g/100 ml Puffer gelöst ist, wird zuvor nach CAMPBELL et al. (21) fettsäurefrei gewaschen.

Vor Beginn der Inkubation, die 1 Stunde (freies Glycerin) bzw. 3 Stunden (freie Fettsäuren) bei einer Schüttelfrequenz von 60^{-1} Minuten und einer Amplitude von 2 cm in der WARBURG-Apparatur durchgeführt wird , leiten wir durch die Gefäße Carbogen. Die Gefäße werden anschließend luftdicht verschlossen. Zuvor sind dem Inkubationsmedium die jeweils angegebenen Mengen an lipolytisch aktiver Fraktion (Kontrolle mit ACTH bzw. Noradrenalin) und das gewogene Fettgewebe zugegeben worden.

Am Ende der Inkubationszeit wird das Fettgewebe rasch aus den Gefäßen entfernt. Im Medium werden freies Glycerin bzw. freie Fettsäuren bestimmt.

Die Freisetzung des freien Glycerins ist in

$\mu\text{Mol}/100 \text{ mg Fettgewebe 1 Stunde}$,

die der freien Fettsäuren in

$\mu\text{Val}/100 \text{ mg Fettgewebe 3 Stunden}$

angegeben.

E IV Hemmung der in vivo - Lipolyse durch Immunserum

Zur Absorption werden 0,25 mg lipolytisch aktive Fraktion und ein äquivalentes Volumen Immunserum, das nach D II ermittelt wird, mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 3 ml aufgefüllt, 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, abzentrifugiert (Laborzentrifuge, Fa. Christ, Osterrode), und der Überstand den Versuchstieren subcutan injiziert.

E V Biologische Tests und Bezugsquellen von Hypophysenhormonen

E V 1 Die ACTH-Aktivität wurde von Herrn Dr. NEUMANN, Berlin, mit dem Ascorbinsäureverarmungstest (136) bestimmt.

E V 2 Die TSH-Aktivität wurde von Herrn Dr. LOUWERENS, Fa. Organon, Holland, an der Ratte mit der Iodocaseinmethode geprüft.

E V 3 Die STH-Aktivität wurde radioimmunologisch durch Herrn Dr. QUABBE, Klinik Berlin, gemessen.

E V 4 ACTH vom Schwein beziehen wir von der Fa. Schering, Berlin, synthetisches MSH von der Fa. Hoechst, Frankfurt, und TSH (in dieser Arbeit als Roh-TSH bezeichnet) vom Schwein von der Fa. Organon, München.

F Statistik (37)

Die Schätzung der Standardabweichung des Einzelwertes ist berechnet nach

$$s_x = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

(x = Einzelwert, $\bar{x}$ = Schätzung des Mittelwertes, n = Fallzahl).

Die Schätzung der Standardabweichung des Mittelwertes ergibt sich aus

$$s_{\bar{x}} = \pm \frac{s_x}{\sqrt{n}} .$$

Signifikanzteste:

In den meisten Fällen werden Paardifferenzen nach dem STUDENT-Test (t-Test) geprüft (hypothetischer Mittelwert $\mu = 0$). Prüfquotient:

$$\frac{\bar{d} \sqrt{n}}{s_x} \quad (\bar{d} = \text{der aus der Summe der Paardifferenzen errechnete Mittelwert}).$$

Freiheitsgrad von s_x : $\sqrt{v} = n - 1 \leq 200$.

Bei nicht gepaarten Werten werden die Mittelwerte miteinander verglichen. Prüfquotient:

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_{x_1}^2}{n_1} + \frac{s_{x_2}^2}{n_2}}} ,$$

$$\text{Freiheitsgrad } \nu = \frac{k^2}{\nu_1} + \frac{(n-k)^2}{\nu_2}$$

$$(\nu_1 = n_1 - 1, \nu_2 = n_2 - 1, k = \frac{n_2 s_{x_1}^2}{n_2 s_{x_1}^2 + n_1 s_{x_2}^2}).$$

Als Signifikanzschranken sind in beiden Fällen

2 P nach den Tabellen der "Documenta Geigy" (37) angegeben.

Regressionsfunktionen werden berechnet nach

$$y = \bar{y} + b_{yx} (x - \bar{x})$$

($\bar{x}$, $\bar{y}$ sind die Schätzungen der Mittelwerte von x, der unabhängigen, nicht Variablen, und y, der abhängigen, zufälligen Variablen. b_{yx} ist der Regressionskoeffizient).

Alle Berechnungen erfolgen mit auf Magnetkarten gespeicherten Programmen für den Tischcomputer "programma 101" (Fa. Olivetti, Turin, Italien).

LYOPHILISIERTE HYPOPHYSEN

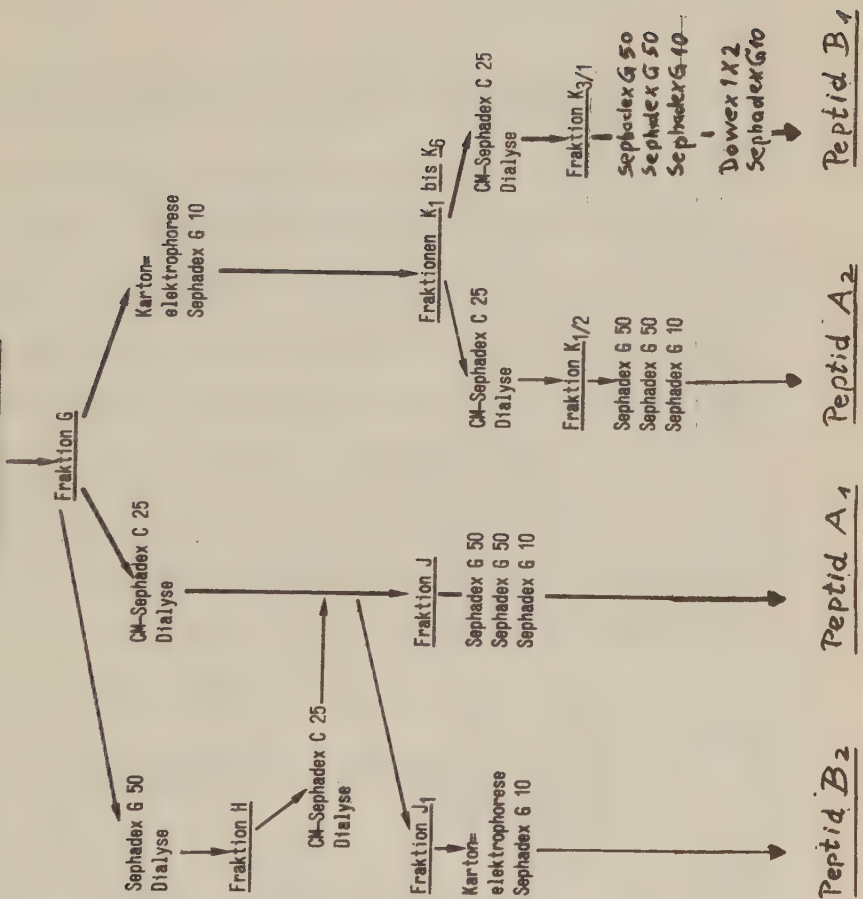


Abb. 3 Schema der Gewinnungswege der lipolytisch aktiven Peptide

E R G E B N I S S E

G Präparation der lipolytisch aktiven Peptide

In Abb. 3 sind die verschiedenen Wege der Peptidgewinnung dargelegt. Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich, daß in der Rohfraktion G zwei lipolytisch aktive Peptide enthalten sind, die von uns Peptid A bzw. Peptid B genannt worden sind. Da wir beide Peptide auf zwei verschiedenen Wegen gewonnen haben, wurden die einzelnen Peptide zusätzlich mit einer Nummer versehen (Peptide A₁ , A₂ , B₁ und B₂). Mit dem nach allen geprüften Kriterien reinstem Peptid A₁ wurden Ultrazentrifugen- und Aminosäureanalysen durchgeführt. Erste Ultrazentrifugenuntersuchungen liegen bisher auch von der Vorstufe des Peptides B₁ vor.

G I Peptid A₁

Säulenchromatographische Weiterverarbeitung der
Rohfraktion

G I 1 Chromatographie der Fraktion G auf
CM-Sephadex C 25

Die vorbereitete Rohfraktion (200 mg, siehe B IV 3) wird auf einer CM-Sephadex C 25 - Säule wie angegeben chromatographiert. Die beiden Unterfraktionen J₁ und J - Peakmaxima bei Glas 14 und 71 - werden von je 5 Säulen gepoolt, dialysiert und lyophilisiert (Abb. 4) .

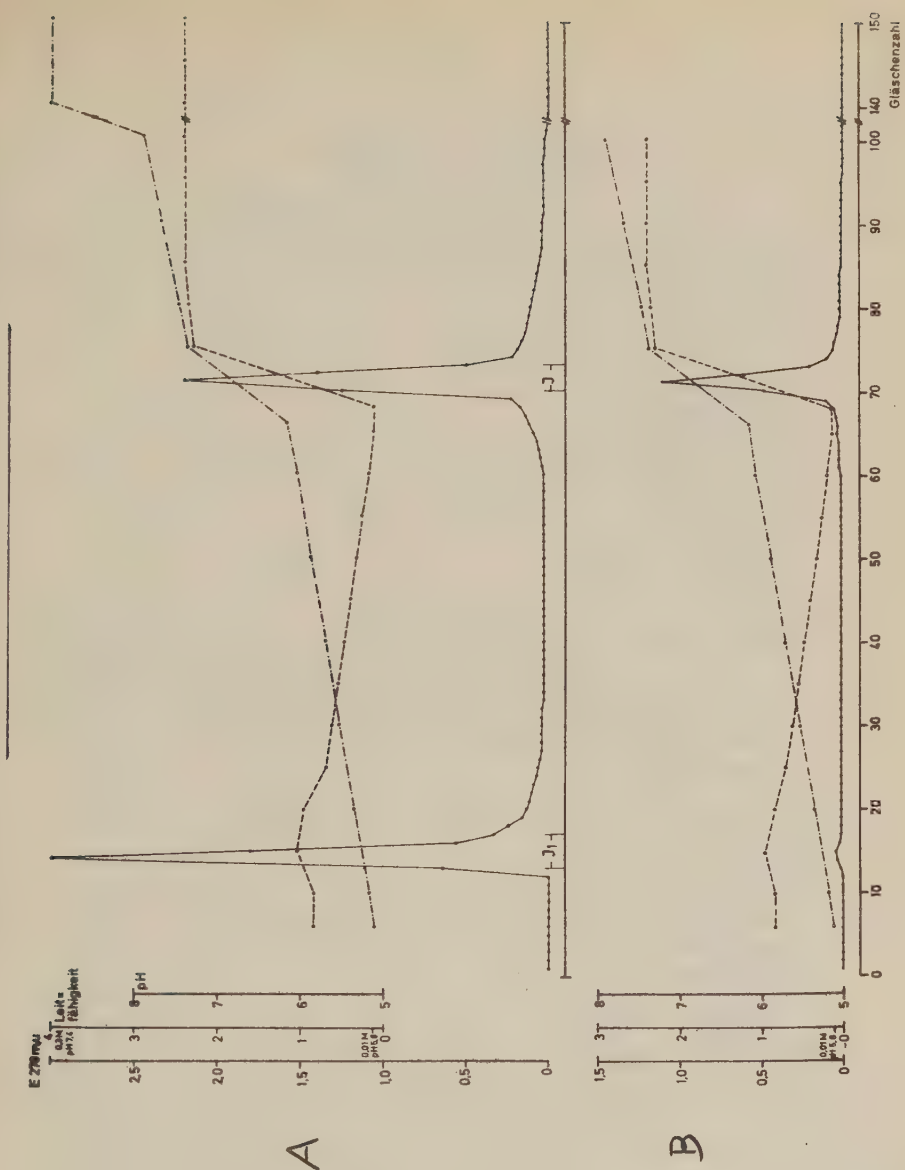


Abb. 4 A Säulenchromatogramm von 200 mg Fraktion G auf CM-Sephadex C 25 (39 x 2,2 cm, Äquilibriumierung mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 , kontinuierliche Gradientenelution mit je 200 ml 0,01 M (pH 5,8) und 0,3 M (pH 7,4) Natriumphosphatpuffer). Sammelfraktionen 3,6 ml, Durchflußrate 140 ml/h.

Abb. 4 B Rechromatogramm von 20 mg Fraktion J bei gleichen Bedingungen.

Extinktion 278 nm — . pH --- . Leitfähigkeit -.-.-.

Aus 1000 mg Fraktion G

	Fraktion J in mg	Fraktion J ₁ in mg	n
Substanzertrag nach Gewicht	85,7 ± 18,8	281,8 ± 26,9	18
Proteinерtrag nach LOWRY <u>VOR</u> Dialyse	113,8 ± 18,0	196,1 ± 49,4	18
Proteinерtrag nach LOWRY <u>NACH</u> Dialyse	60,6 ± 10,6	186,8 ± 44,0	18
Minus an Protein in %	46,8	4,7	

	Fraktion K _{1/2} in mg	Fraktion K _{3/1} in mg	
Substanzertrag nach Gewicht	37,5 ± 4,1	38,5 ± 5,7	5
Proteinерtrag nach LOWRY <u>VOR</u> Dialyse	33,4 ± 5,8	26,0 ± 5,1	5
Proteinерtrag nach LOWRY <u>NACH</u> Dialyse	26,4 ± 3,3	25,2 ± 5,2	5
Minus an Protein in %	21	3	

Tab. 2 Ausbeute an lipolytisch aktiven Fraktionen aus 1 g Fraktion G in Beziehung zum Proteinерtrag nach der Methode von LOWRY et al. (89) vor und nach Dialyse.

$$\bar{x} \pm s_x.$$

Die lipolytisch aktive Rohfraktion, die wir aus Schweinehypophysen gewinnen konnten, ließ sich auf dem Kationenaustauscher CM-Sephadex C 25 in zwei Unterfraktionen aufteilen, wobei die Ausbeute an der lipolytisch stärker aktiven Unterfraktion J 8,6 % betrug.

Bei der Elution der Fraktion J stiegen pH und Ionenkonzentration an. Das Absinken des pH vor dem Umschlag erwies sich als ein Charakteristikum des Ionenaustauschers, da er auch bei der Leerschromatographie ohne aufgetragene Fraktion auftrat.

Bei der Dialyse der Fraktionen gegen Aqua bidest. bestimmten wir den Proteingehalt vor und nach Dialyse nach der in C VII angegebenen Methode. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, gingen bei Fraktion J 46,8 % Eiweiß, bei Fraktion J₁ praktisch kein Eiweiß durch die Membran des Dialysierschlauches verloren. Da die lipolytische Aktivität von Fraktion J dabei nicht abnahm, ist dieser Verlust von niedrigmolekularem Eiweiß ein zusätzlicher Reinigungsschritt.

Die Entsalzung der Fraktionen J₁ und J durch Gelfiltration haben wir wieder verlassen, weil eine Trennung von Proteinpeaks und Salzpeak (Natriumphosphat) sich nicht befriedigend durchführen ließ.

Fraktion	mg
Lyophilisierte Schweinehypophysen	1000
Fraktion G	20,8
Fraktion J	1,8
Peptid A ₁	0,3
Fraktion J ₁	5,9
Peptid B ₂	0,7
Fraktion K ₁	2,1
Fraktion K _{1/2}	0,8
Fraktion K ₃	1,2
Fraktion K _{3/1}	0,8
Fraktion K _{3/1} G 50 rechro	0,3
Peptid B ₁	0,23

Tab. 3 Ausbeute an lipolytisch aktiven Fraktionen aus
1 g lyophilisierte Schweinehypophysen.

G I 2 Rechromatographie der Fraktion J auf

CM-Sephadex C 25

20 mg der in 3 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, gelösten Fraktion J werden nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile (8000 g , 15 min.) unter den obigen Bedingungen auf einer CM-Sephadex C 25 - Säule chromatographiert (Abb. 4 B). Die Rechromatographie ergab einen einheitlichen Peak mit dem Extinktionsmaximum bei Glas 71.

G I 3 Chromatographie der Fraktion J auf Sephadex G 50, Rechromatographie und Entsalzung auf Sephadex G 10

100 mg der in ml 0,1^M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4 , gelösten und wie in G I 1 zentrifugierten Fraktion J werden auf einer Sephadex G 50 fine - Säule unter folgenden Bedingungen chromatographiert: Elutionspuffer 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4 , Durchflußrate 80 ml/h , Sammelfraktionen 3 ml. Die beiden Peaks werden getrennt gesammelt und lyophilisiert: Fraktion J_{G 50 1} (Peakmaximum bei Glas 19) und Fraktion J_{G 50 2} (Peakmaximum bei Glas 28) - Abb. 5 A - .
Fraktion J_{G 50 1} ist lipolytisch inaktiv.

Die lipolytisch aktive Fraktion J_{G 50 2} (Proteinanteil 50 mg) wird in 3 ml Puffer gelöst und unter gleichen Bedingungen auf Sephadex G 50 fine chromatographiert, wobei wir die einheitliche Fraktion J_{G 50 2} rechro

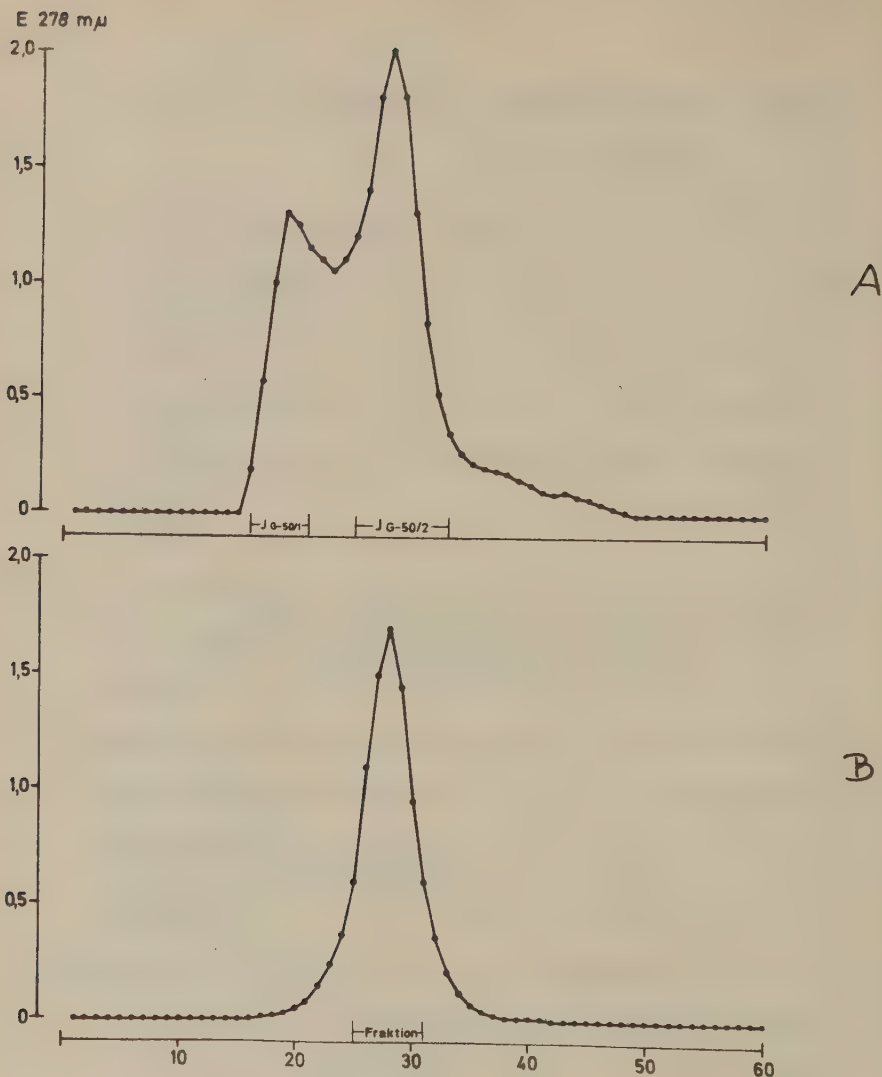


Abb. 5 A Säulenchromatogramm von 100 mg Fraktion J auf Sephadex G 50 fine (39 x 2,2 cm , 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4). Sammelfraktionen 3 ml, Durchflußrate 80 ml/h.

Abb. 5 B Rechromatogramm von 50 mg Fraktion J auf Sephadex G 50 2 bei gleichen Bedingungen.

Extinktion 278 nm — .

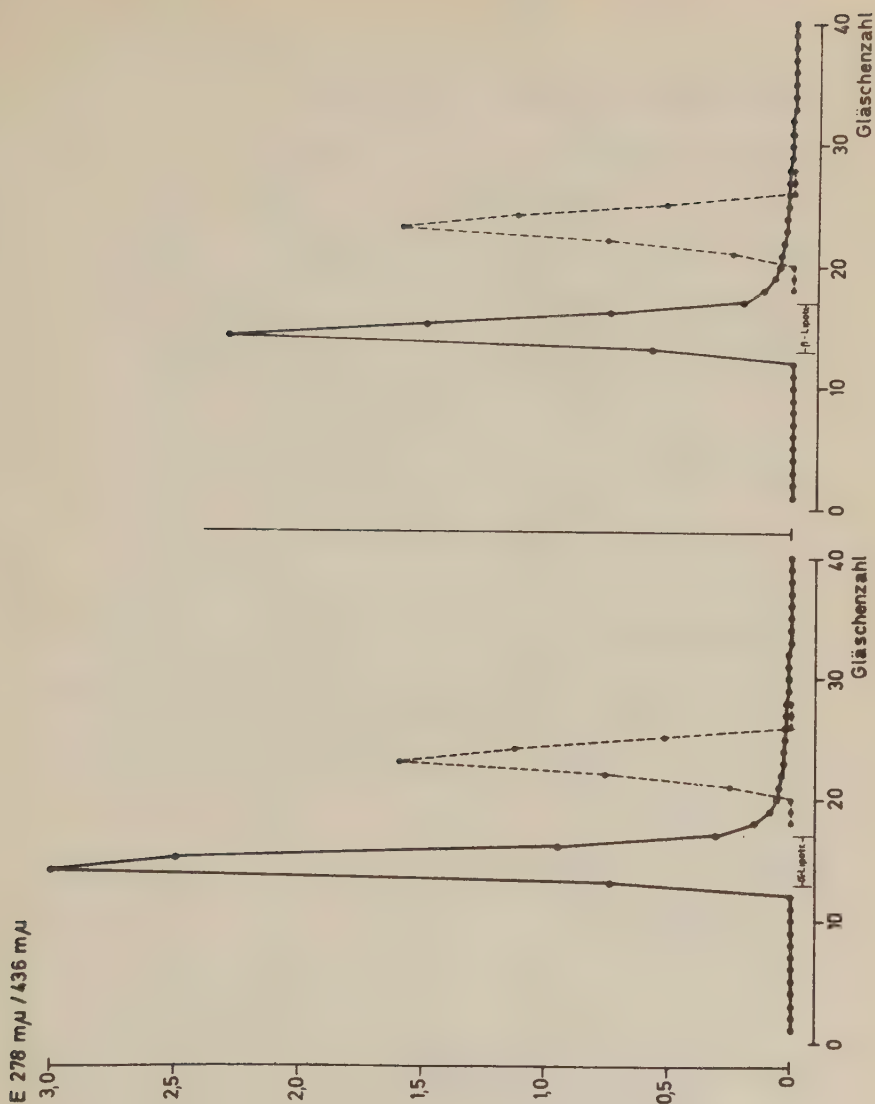


Abb. 6 Säulenchromatogramme von Fraktion J_G 50 2 rechro und Fraktion K_{3/1} G 50 rechro (Auftragsmenge siehe Text) auf Sephadex G 10 (39 x 2,2 cm , Aqua bidest.). Sammelfraktionen 3 ml, Durchflußrate 80 ml/h. Extinktion 278 nm — . Salzpeak (436 nm) --- .

mit dem Maximum bei Glas 28 erhalten (Abb. 5 B) .

Nach dem Lyophilisieren wird die Fraktion $J_G 50 2$ rechrom in 3 ml Aqua bidest. gelöst (80 mg Protein - Salz - Gemisch) und wie angegeben auf Sephadex G 10 entsalzt (Salzpeakbestimmung nach C VIII 1) und lyophilisiert: Peptid A_1 mit dem Extinktionsmaximum bei Glas 14 (Abb. 6 A) . Die Ausbeute an Peptid A_1 aus Fraktion J beträgt 16,7 %.

Die lipolytisch nicht aktive Fraktion $J_G 50 1$ wird ebenfalls durch Gelfiltration als ein einheitlicher Peak entsalzt.

Nach Versuchen mit Sephadex G 25 fine , 50 fine , 50 superfine , 75 , 100 , 200 , bei denen übereinstimmende Chromatogramme resultierten, entschieden wir uns für Sephadex G 50 fine, da hier die höchste Trennschärfe für die beiden Peaks erreicht wurde. Die Anwendung von Sephadex G 50 superfine erbrachte keine Verbesserung der Trennung.

Die Ausbeute der einzelnen Fraktionen ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

G II Peptid A_2 und Peptid B_1

Kartonelektrophorese als Vorreinigung der Rohfraktion

G II 1 Kartonelektrophorese der Fraktion G und
Entsalzung auf Sephadex G 10

1 g der vorbereiteten Rohfraktion (siehe B IV 3) läßt sich kartonelektrophoretisch in 6 Unterfrak=

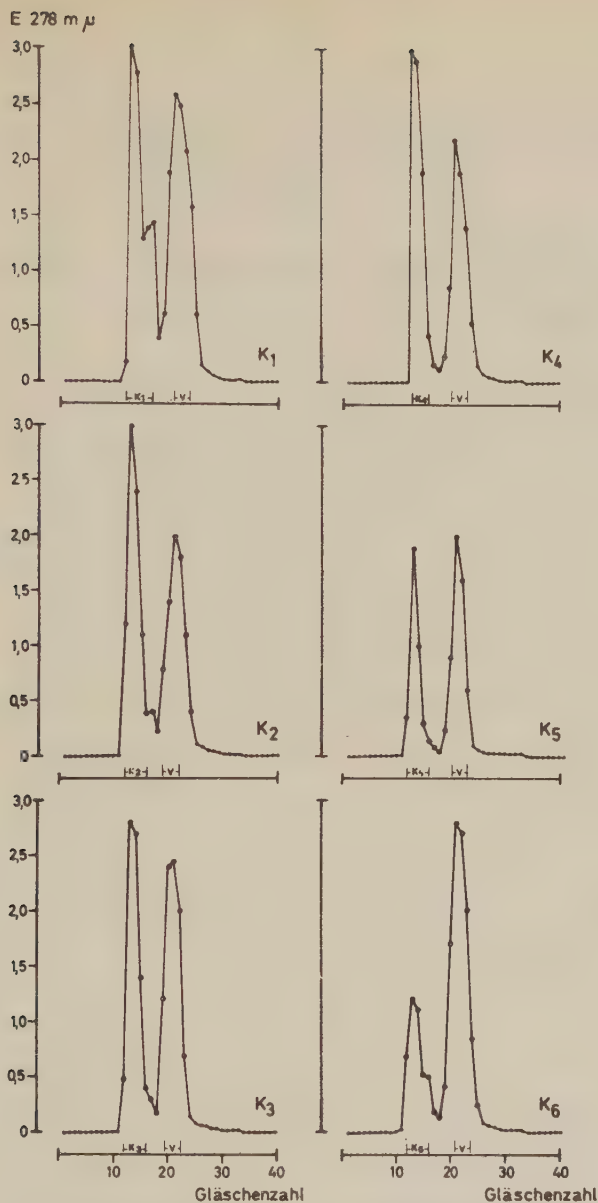


Abb. 7 Säulenchromatogramme von Fraktion K₁ bis K₆ (Auftragsmenge siehe Text) auf Sephadex G 10 (39 x 2,2 cm , Aqua bidest.). Sammelfraktionen 3 ml, Durchflußrate 80 ml/h. Extinktion 278 nm — . V ≙ Barbitalspeak.

tionen K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , K_5 , K_6 auftrennen.

Während die elektrophoretische Beweglichkeit der Fraktionen K_1 bis K_5 dem Globulin / Albumin - Bereich entsprechen, wandert Fraktion K_6 schneller als die Plasmaeiweiße.

Die ausgepreßten und lyophilisierten Fraktionen (Proteinanteil Fraktion K_1 75 mg , K_2 70 mg, K_3 90 mg , K_4 60 mg , K_5 35 mg , K_6 60 mg , die Zahlen gelten jeweils für eine aufgetrennte Charge) werden nach Lösen in 3 ml Aqua bidest. und Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (8000 g , 15 min.) auf Sephadex G 10 entsalzt. Das Maximum des Proteinpeaks liegt jeweils bei Glas 14, das des Barbitalpeaks bei Glas 21 (Abb. 7). Der Substanzgewinn beträgt 39 % mit einem Anteil von 10 % Fraktion K_1 und 5,8 % K_3 .

Die Banden der präparativen und CAF - Elektrophorese (H V) entsprachen einander.

Abweichend von der von KNEDEL und SPERL (81) angegebenen Methode der Einengung und Entsalzung durch Ultrafiltration haben wir die Fraktionen auf Sephadex G 10 entsalzt. Der Barbitalnachweis wurde wie in C VIII 3 angegeben geführt. Die Proteinbestimmung nach C VII ergab keinen Eiweißgehalt in den Salzpeaks.

Als lipolytisch aktiv erwiesen sich die Fraktionen K_1 und K_3 .

G II 2 Chromatographie der Fraktionen K_1 und K_3
auf CM-Sephadex C 25

Die lipolytisch aktiven Fraktionen K_1 und K_3 (40 mg in 3 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 , gelöst) werden weiterhin auf einer CM-Sephadex C 25 - Säule chromatographiert. Die Unterfraktionen $K_{1/1}$, $K_{1/2}$, $K_{3/1}$, $K_{3/2}$, Extinktionsmaxima jeweils bei Glas 14 und 71, werden dann dialysiert und lyophilisiert. Lipolytisch aktiv sind Fraktion $K_{1/2}$ (Substanzausbeute 38 %) und Fraktion $K_{3/1}$ (Ausbeute 66 %) - Abb. 8 A und 8 B .

Das Verhalten von pH und Ionenkonzentration entsprach den bei der Chromatographie von Fraktion J erhobenen Befunden.

Bei der Proteinbestimmung vor und nach Dialyse nach der in C VII angegebenen Methode gingen bei Fraktion $K_{1/2}$ 21 %, bei Fraktion $K_{3/1}$ praktisch kein niedermolekulares Eiweiß durch die Dialysierschlauchmembran, wobei die lipolytische Aktivität unverändert blieb. Wie Fraktion J wurde also auch Fraktion $K_{1/2}$ durch die Dialyse zusätzlich gereinigt (Tabelle 2) .

Neben den Fraktionen K_1 und K_3 prüften wir auch das Verhalten von den Fraktionen K_2 und K_4 auf CM-Sephadex C 25 . Dabei ergab sich, daß die elektrophoretisch schnell wandernden Fraktionen nicht adsorbiert, die langsam wandernden adsorbiert und bei dem Extinktionsmaximum, das dem der Fraktion J entsprach, eluiert wurden (Abb. 8 A und 8 B) .

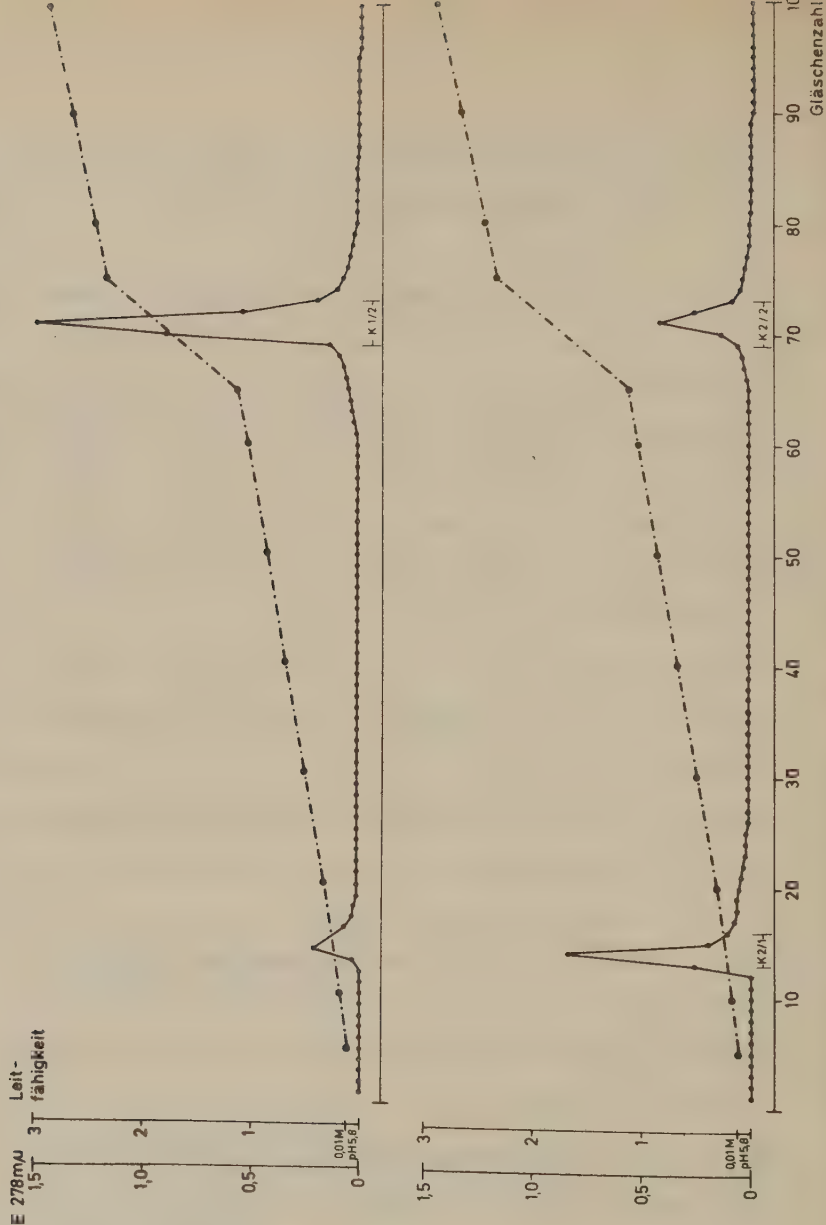


Abb. 8 A Säulenchromatogramme von je 40 mg Fraktion K₁ bzw. K₂ auf CM-Sephadex C 25 (39 x 2,2 cm, Äquilibriumierung mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 , kontinuierliche Gradientenelution mit je 200 ml 0,01 M (pH 5,8) und 0,3 M (pH 7,4) Natriumphosphatpuffer). Sammelfraktionen 3,6 ml , Durchflußrate 140 ml/h.

Fraktion K₁ oben , Fraktion K₂ unten.

Extinktion 278 nm — . Leitfähigkeit -.-.- .

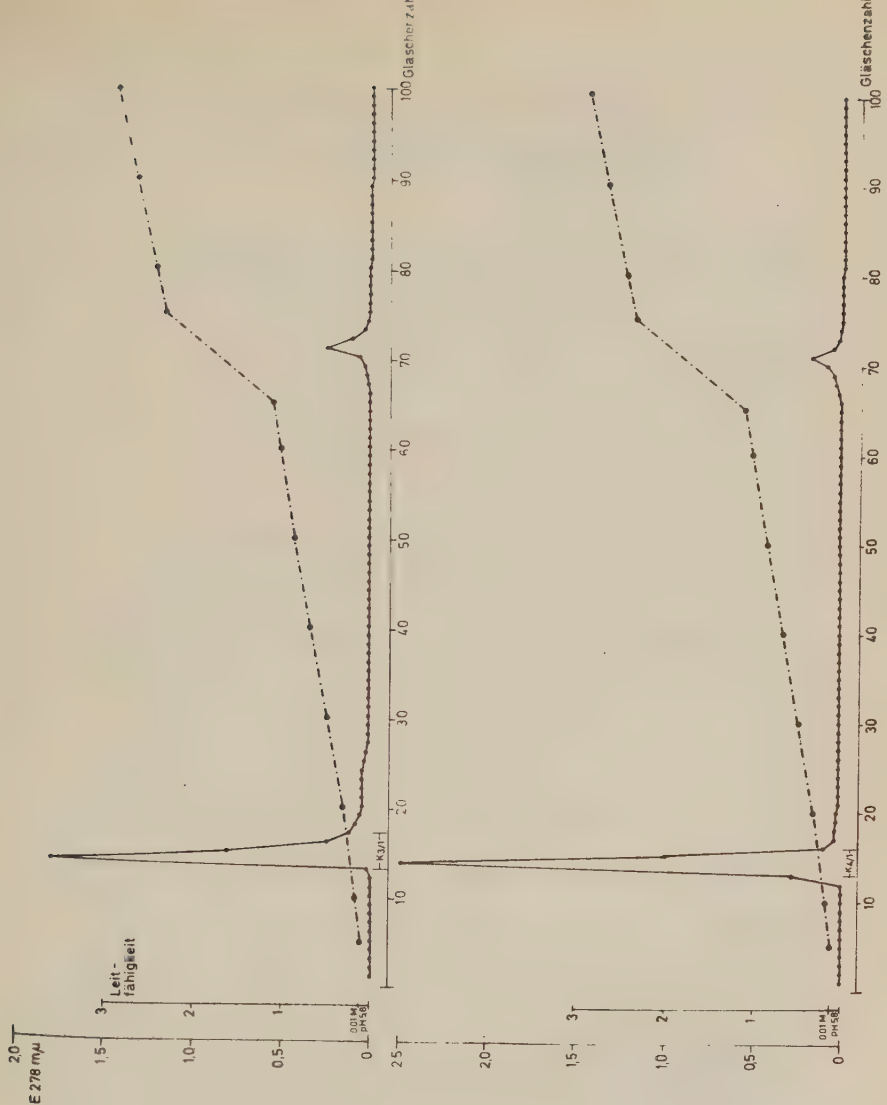


Abb. 8 B Säulenchromatogramme von je 40 mg Fraktion K₃ bzw. K₄ auf CM-Sephadex C 25 (39 x 2,2 cm, Äquilibriumierung mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 , kontinuierliche Gradientenelution mit je 200 ml 0,01 M (pH 5,8) und 0,3 (pH 7,4) Natriumphosphatpuffer). Sammelfraktionen 3,6 ml , Durchflußrate 140 ml/h.

Fraktion K₃ oben , Fraktion K₄ unten.

Extinktion 278 nm — . Leitfähigkeit -.-.- .

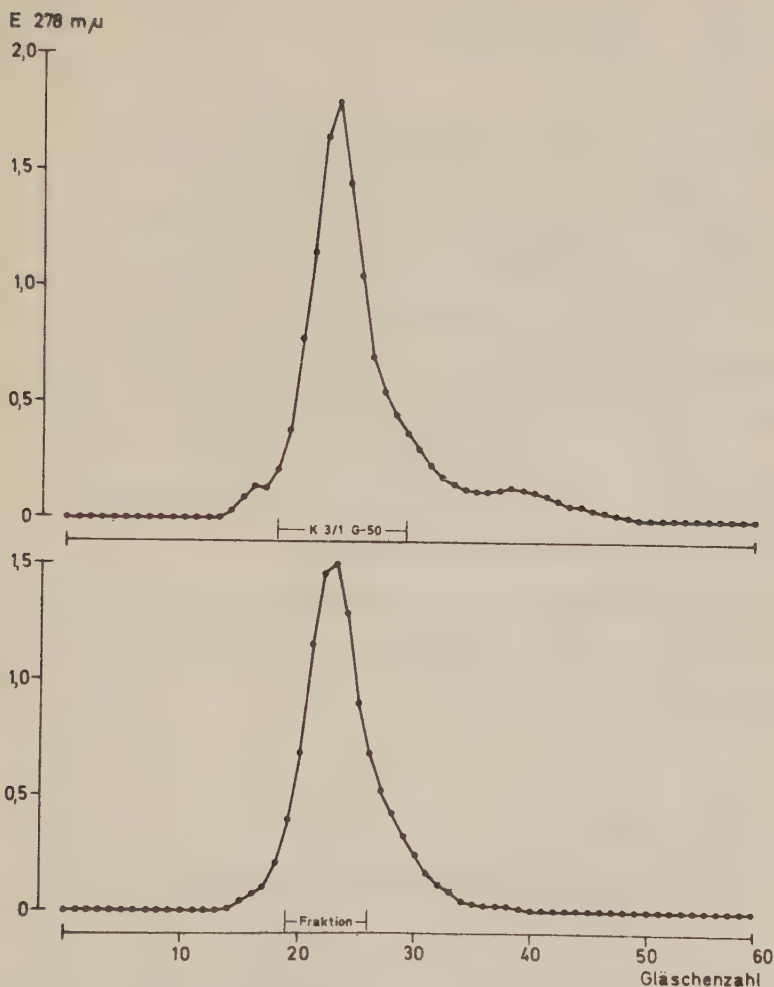
58

G II 3 Chromatographie auf Sephadex G 50 fine,
Rechromatographie und Entsalzung auf
Sephadex G 10

100 mg der in 3 ml 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4 , gelösten Fraktion K_{3/1} werden auf einer Sephadex G 50 fine - Säule unter der in G I 3 angegebenen Bedingungen chromatographiert und die erhaltene Fraktion K_{3/1} G 50 (Peakmaximum bei Glas 24) lyophilisiert (Abb. 9 A) .

Fraktion K_{3/1} G 50 (Proteinanteil 50 mg) wird in 3 ml Puffer gelöst und unter gleichen Bedingungen auf Sephadex G 50 fine chromatographiert, wobei wir die einheitliche Fraktion K_{3/1} G 50 rechro mit dem Maximum bei Glas 24 erhalten (Abb. 9 B) . Nach der Gefriertrocknung wird Fraktion K_{3/1} G 50 rechro in 3 ml Aqua bidest. gelöst (80 mg Protein - Salz - Gemisch) und auf Sephadex G 10 entsalzt (Extinktionsmaximum bei Glas 14, Salzpeakbestimmung nach C VIII 1, Gewinn aus Fraktion K_{3/1} 37,5 %) und lyophilisiert (Abb. 6 B) .

Auf Sephadex G 50 fine ergibt Fraktion K_{1/2} ein Chromatogramm, das dem von Fraktion J (Extinktionsmaximum des lipolytisch aktiven Anteils bei Glas 28) entspricht. Nach Rechromatographie und Entsalzung auf Sephadex G 10 wird Peptid A₂ erhalten (Substanzgewinn aus Fraktion K_{1/2} 16,2 %) .



A

B

Abb. 9 A Säulenchromatogramm von 100 mg Fraktion $K_{3/1}$ auf Sephadex G 50 fine (39 x 2,2 cm , 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4). Sammelfraktionen 3 ml, Durchflußrate 80 ml/h.

Abb. 9 B Rechromatogramm von 50 mg Fraktion $K_{3/1}$ G 50 bei gleichen Bedingungen.

Extinktion 278 nm — .

G II 4 Chromatographie der Fraktion $K_{3/1}$ G 50 rechro
auf Dowex 1X2

30 mg der in 3 ml 0,05 N Essigsäure gelösten Fraktion $K_{3/1}$ G 50 rechro werden auf einer Dowex 1X2 - Säule wie angegeben chromatographiert: Elution mit 0,05 N (Glas 1) und 1 N Essigsäure (Glas 36) - Abb. 10 . Die Unterfraktionen $K_{3/1}$ D 1 (Peakmaximum Glas 8) , $K_{3/1}$ D 2 (Maximum Glas 21) und $K_{3/1}$ D 3 (Maximum Glas 58) werden gepoolt und lyophilisiert. Die lipolytisch aktive Fraktion $K_{3/1}$ D 2 wird auf einer Sephadex G 10 - Säule entsalzt (Maximum Glas 14, Salznachweis nach M V C 4 , Ausbeute 20 %) und als Peptid B_1 bezeichnet.

Die Ionenkonzentration stieg diskontinuierlich bei Elution der Peaks an ($K_{3/1}$ D 2 Umschlag auf 0,05 N , $K_{3/1}$ D 3 Umschlag auf 1 N Essigsäure) .

G III Peptid B_2

Kartonelektrophoretische Weiterverarbeitung
der Fraktion J_1

Auch aus Fraktion J_1 , dem weniger stark lipolytisch aktiven Anteil des auf CM-Sephadex C 25 chromatographierten Rohextraktes, konnten wir ein Peptid B gewinnen.

1 g der, wie in B IV 3 für Fraktion G angegeben, vorbereiteten Fraktion J_1 , das in der CAF - Elektro-

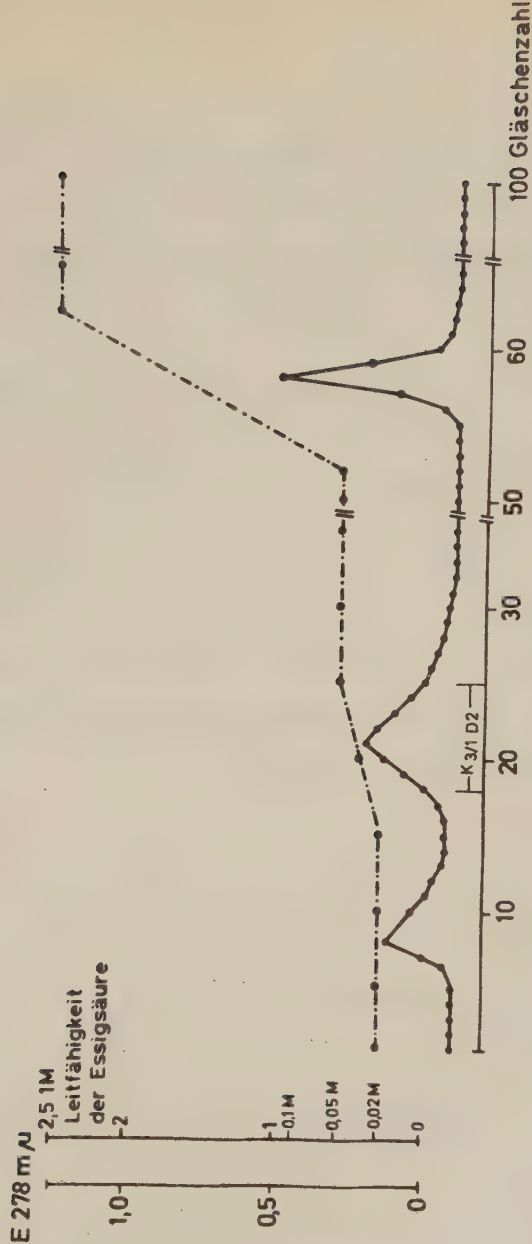


Abb. 10 Säulenchromatogramm von 30 mg Fraktion $K_{3/1}$ G 50 *rechromat.* auf Dowex 1X2 (36 x 1,6 cm , Äquilibrierung mit 0,02 N Essigsäure, stufenweise Elution mit 0,05 N (Glas 1), 0,1 N Essigsäure (Glas 36)). Sammelfraktionen 3,6 ml, Durchflußrate 80 ml/h. Extinktion 278 nm — . Leitfähigkeit -.-.- .

phorese 2 Banden (entsprechend den Fraktionen K_3 und K_4 , siehe H V) zeigt, wird kartonelektrophoretisch in die Fraktionen J_{1/K_3} , J_{1/K_4} und $J_{1/K_{\text{Rest}}}$ aufgetrennt, die exprimiert und lyophilisiert werden. Nach Lösen in 3 ml Aqua bidest. und Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (8000 g , 15 Minuten) wird die lipolytisch aktive Fraktion J_{1/K_3} auf Sephadex G 10 entsalzt: Peptid B_2 (Ausbeute 12 %) .

Das Sephadex G 10 - Chromatogramm ist einheitlich. Auch bei Chromatographie auf Sephadex G 50 fine erscheint Peptid B_2 als einheitlicher Peak, dessen Extinktionsmaximum dem des Peptides B_1 entspricht (Glas 24) .

Die Ausbeute der einzelnen Fraktionen ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

G IV Fraktion J aus Humanhypophysen

Aus Humanhypophysen konnten wir in der in in G I 1 und 2 angegebenen Weise die Peptid A_1 -Vorstufe Fraktion J herstellen. Chromatogramm und Rechromatogramm auf CM-Sephadex C 25 sind mit denen der Schweinefraktionen identisch.

Die Ausbeute betrug 1 mg Fraktion J pro 1000 mg lyophilisierte Humanhypophysen, die Substanzausbeute 7,9 %.

Es ist möglich, daß bei Verarbeitung größerer Mengen Humanhypophysen ein höherer Anteil lipolytisch aktiver Fraktion erhalten wird. Weitere Untersuchungen konnten aus Mangel an Humanhypophysen bisher nicht durchgeführt werden.

H Physikochemische Eigenschaften und Reinheits-
kriterien der lipolytisch aktiven Peptide

H I Proteingehalt

Tabelle 4 gibt den Eiweißgehalt der Fraktionen (Biuret) an. Der Proteingehalt nahm mit der Zahl der Reinigungsschritte zu.

Tabelle 4 Proteingehalt der Fraktionen

Fraktion	% Protein (Biuret) , n = 6 $\bar{x} \pm s_x$
G	58,7 $\pm$ 2,2
J	77,7 $\pm$ 2,2
Peptid A ₁	99,4 $\pm$ 2,0
K ₁	72,3 $\pm$ 2,5
K _{1/2}	82,0 $\pm$ 2,3
Peptid A ₂	99,5 $\pm$ 2,2
K ₃	71,9 $\pm$ 2,4
Peptid B ₁	99,6 $\pm$ 2,4
J ₁	70,0 $\pm$ 3,2
Peptid B ₂	95,4 $\pm$ 2,8

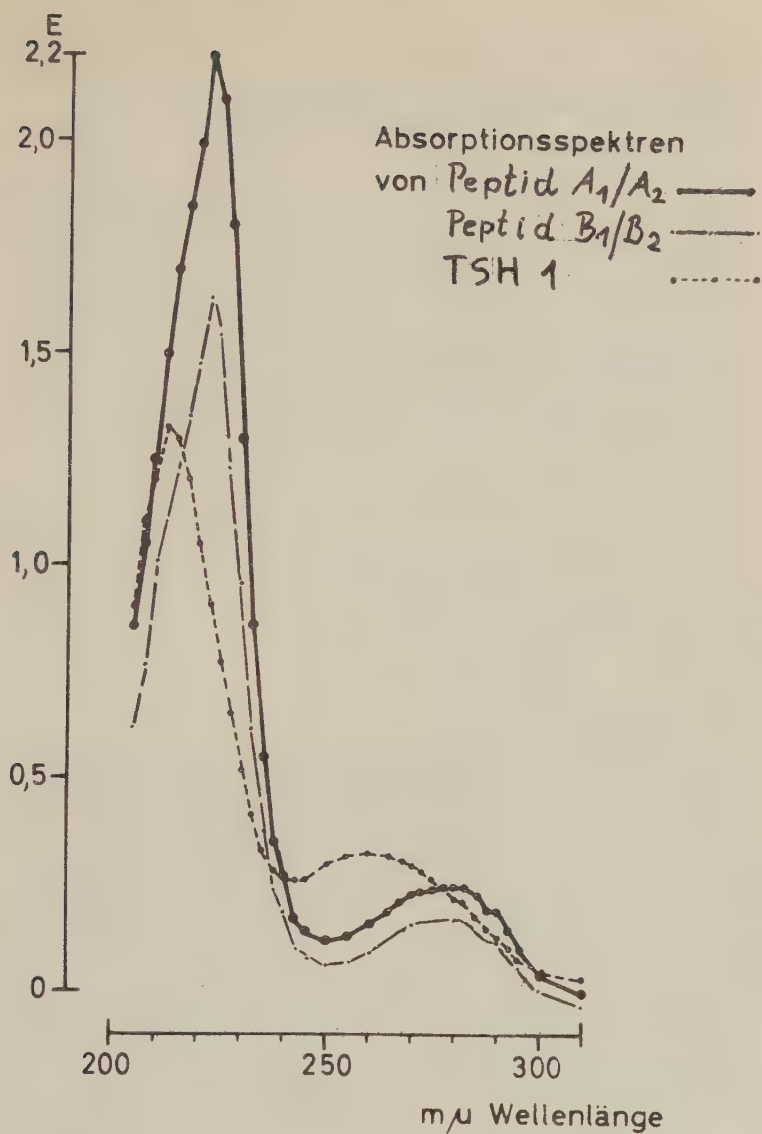


Abb. 11 Absorptionsspektren der Peptide und des TSH 1, pH 5,8, Konzentration 0,25 mg/ml, Messung gegen Aqua bidest., Schichtdicke 1 cm.

H II Ultraviolettlichtspektrum der lipolytisch aktiven Peptide

Die Peptide A_1 , A_2 und B_1 , B_2 haben Absorptionsmaxima bei 223 nm und Doppelgipfel bei 280 nm und 290 nm bei dem pH des Aqua bidest. (pH 5,8). Die Extinktionswerte der B-Peptide liegen unter denen der A-Peptide.

In Abb. 11 sind die Spektralkurven der Peptide im Vergleich zu der Kurve des TSH 1 (L IV 2) eingezeichnet.

H III Dowex 1x2 - Chromatographie

H III 1 Peptide A_1 und A_2

20 mg der in 3 ml 0,05 N Essigsäure gelösten Fraktion J werden nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (8000 g , 15 Minuten) auf einer Dowex 1X2 - Säule wie angegeben chromatographiert: Elution mit 0,05 N (Glas 1) , 0,1 N (Glas 44) , 1 N Essigsäure (Glas 84) .

Ohne adsorbiert zu werden, wurde Fraktion J, die Vorstufe des Peptides A_1 , als einheitlicher Peak mit der 0,05 N Essigsäure eluiert (Abb. 12) .

Fraktion K_1 , die Vorstufe des Peptides A_2 , ergab unter gleichen Bedingungen ein identisches Chromatogramm.

H III 2 Peptid B_1

siehe G II 4 .

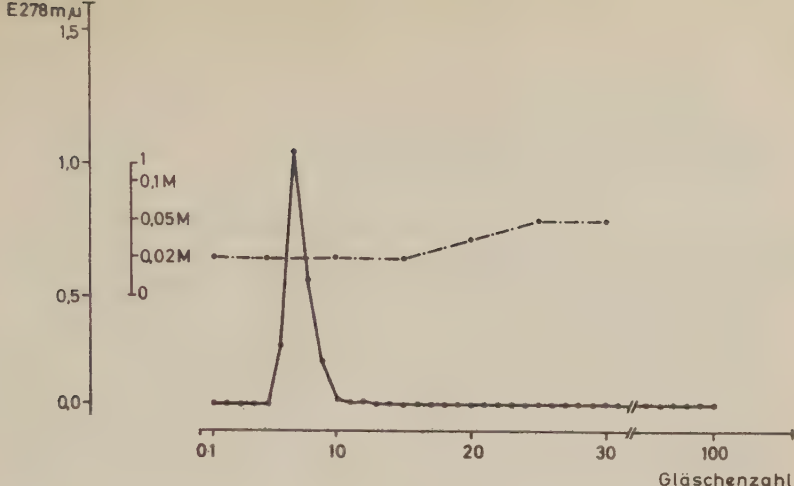
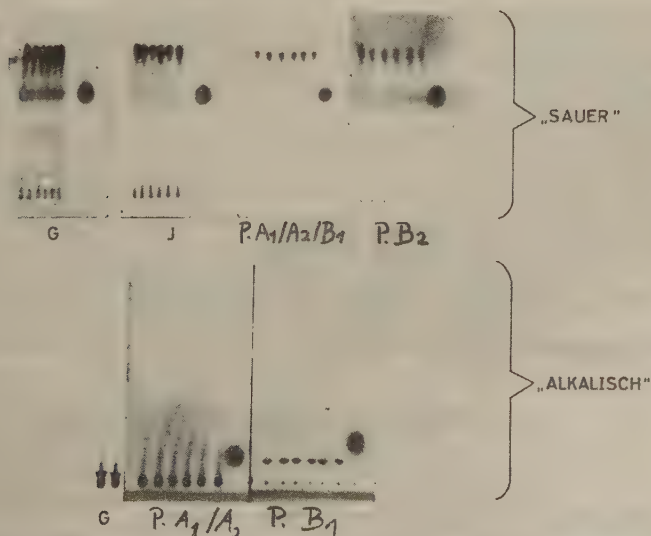


Abb. 12 Säulenchromatogramm von 20 mg Fraktion J auf Dowex 1X2 (36 x 1,6 cm , Äquilibriumierung mit 0,02 N Essigsäure, stufenweise Elution mit 0,05 N (Glas 1) , 0,1 N (Glas 44) , 1 N Essigsäure (Glas 84)) . Sammelaktionen 3,6 ml, Durchflußrate 80 ml/h. Extinktion 278 nm — , Leitfähigkeit -.-.- .



SAUER: N-Butanol - Eisessig - Wasser (1:1:1), pH 2,1, 2,5 Std., Alaninreferenz
ALKALISCH: Amylalkohol - Pyridin - Wasser (35:35:30), pH 9,1, 3 Std., Alaninreferenz

Abb. 13 Dünnschichtchromatogramme der lipolytischen Fraktionen in System 1 (pH 2,1) und System 3 (pH 9,1) .

H IV Dünnschichtchromatographie

Der Fortgang der Reinigung wurde routinemäßig mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie kontrolliert (Abb. 13) .

In dem stark sauren Laufmittel Butanol(1) - Eisessig - Wasser wanderten alle Peptide ausgesprochen gut.

Der lipolytisch aktive Anteil der Rohfraktion G ist in der intensiv gefärbten, schnellsten Bande enthalten.

Die Peptide A₁ , A₂ und B₁ , die ein identisches Chromatogramm haben, sind einheitlich. Peptid B₂ hat eine weitere schwache, langsamer wandernde Bande.

Während im System Butanol(1) - Eisessig - Wasser - Pyridin (pH 5,1) nach drei Stunden die A-Peptide etwas, die B-Peptide doppelt so weit wanderten, blieben im alkalischen System Amylalkohol - Pyridin - Wasser die A-Peptide an der Auftragsstelle liegen, während die B-Peptide eine deutliche Wanderung zeigten. Alle Peptide sind in diesen Systemen einheitlich. Aufgetragen wurden: Fraktion G 350 µg , Fraktion J 200 µg , A- , B-Peptide je 100 µg.

In Tabelle 5 sind die R_f - Werte der lipolytisch aktiven Peptide im Vergleich zur Referenzsubstanz Alanin angegeben.

Tabelle 5 Rf - Werte der lipolytisch aktiven Peptide

Laufmittel- system	Peptid A ₁ u. A ₂	Peptid B ₁ u. B ₂	Alanin
System 1 pH 2,1	0,8	0,8 +	0,5
System 2 pH 5,1	0,05	0,12	0,2
System 3 pH 9,1	0,0	0,1	0,2

+ Bei Peptid B₂ Rf-Wert der schnelleren Bande.

H V Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie (Abb. 14 A)

Bei der von uns im alkalischen System vorgenommenen Elektrophorese zeigte die Rohfraktion G fünf Banden, die den kartonelektrophoretischen Fraktionen K₁ bis K₅ entsprachen.

Während Fraktion J₁ zwei Banden - entsprechend K₃ und K₄ - zeigte, hatte Fraktion J drei Banden - entsprechend K₁ (Bande 1 und 2) und K₂ .

Peptid A₁ , die mittlere der drei J-Banden, ist elektrophoretisch einheitlich. Es wanderte bei pH 8,6 kaum und lag im Serum-gamma-Globulin - Bereich.

Fraktion J_{G 50 1} lag in Höhe der dritten und schnellsten J-Bande.

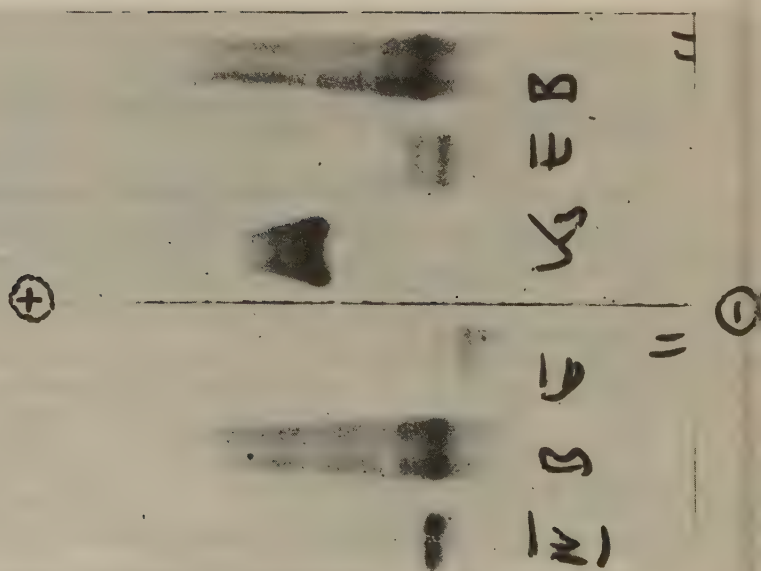
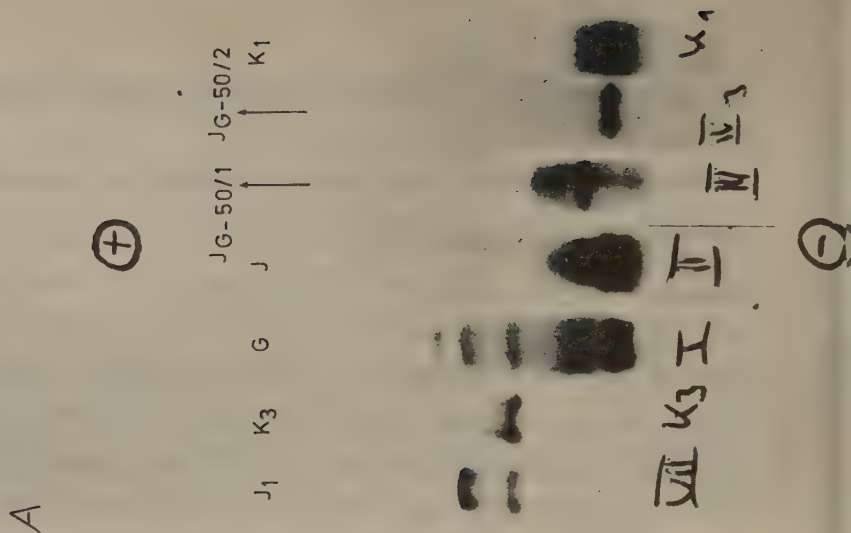


Abb. 14 A CAF-Elektrophorese (von links nach rechts) :
 Fraktionen J_1 , K_3 , G , J , $J_G 50 1$, Peptid A_1 ,
 Fraktion K_1 .

Abb. 14 B (unten) : CAF-Elektrophorese (von links nach
 rechts) : Peptid A_1 , TSH 1 , ACTH , Fraktion K_3 ,
 ACTH , TSH 1 .

Die Kartonelektrophoresefraktion K_1 zeigte noch einen größeren Grad an Verunreinigung als Peptid A_1 . Erst das weiter gereinigte Peptid A_2 ergab eine dem Peptid A_1 entsprechende einheitliche Bande.

Die Vorstufe des Peptides B_1 , Fraktion K_3 , das neben einer Hauptbande noch zwei weitere schwache Banden aufwies, lag im Serum-beta-Globulin - Bereich und hatte eine größere elektrophoretische Mobilität als alle geprüften Hypophysenhormone (L II , III , IV) . Während Peptid B_1 sich einheitlich auf der Folie zeigte, war bei Peptid B_2 noch eine weitere schwache Bande nachweisbar.

Die Konzentrationen der untersuchten Fraktionen betrugen: Fraktion G 20 , J_1 15 , J 7 , K_1 , K_3 , A- und B-Peptide je 4 g/100 ml.

Elektrophoretisch (Celluloseacetatfolie, pH 8,6) unterscheiden sich nach den obigen Befunden A- und B-Peptide deutlich. Nach den unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten ist zu vermuten, daß der isoelektrische Punkt der A-Peptide höher als der der B-Peptide ist.

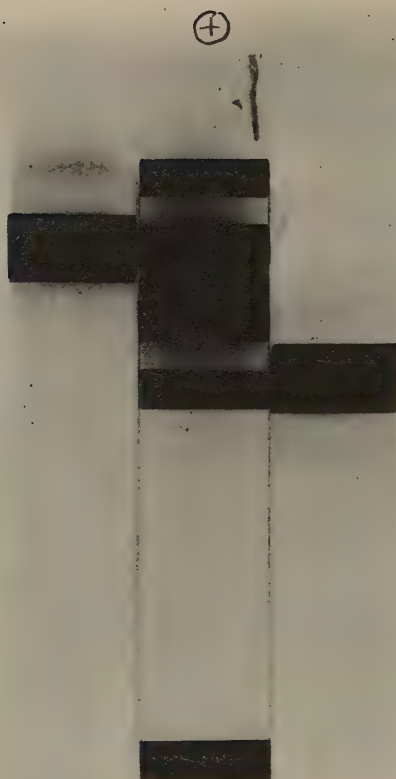


Abb. 15 Acrylamidgelsäulenelektrophorese (von links nach
rechts) : Peptid B₁ (120 ug) , Fraktion G
(350 ug) und Peptid A₁ (120 ug) .

H VI Acrylamidgelelektrophorese

In Abb. 15 sind die Rohfraktion G , Peptid A₁ und Peptid B₁ dargestellt (Konzentrationen G 350 μ g , Peptid A₁ und B₁ je 120 μ g) .

Während Fraktion G mindestens 7 Banden aufwies, waren Peptid A₁ und ebenso Peptid A₂ einheitlich. Bei Fraktion K_{3/1} G 50 rechro zeigte sich neben der Hauptbande noch eine schwächere, langsam wandernde Bande, die bei Peptid B₁ nicht mehr nachzuweisen war.

In dem sauren Milieu (Puffer pH 4,5) wanderten die A-Peptide schneller als die B-Peptide und zeigten damit ein der alkalischen Elektrophorese entgegengesetztes Verhalten. Hieraus ist wiederum zu vermuten, daß der isoelektrische Punkt der A-Peptide höher als der der B-Peptide liegt.

H VII Molekulargewicht

H VII 1 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Mit der in C IV 1 angegebenen Methode bestimmten wir für die lipolytisch aktiven Peptide folgende K_D - Werte

(Abb. 16) :

Peptid A ₁ /A ₂	V _{EL} = 84 ml , K _D = 0,481 ,
Peptid B ₁ /B ₂	V _{EL} = 72 ml , K _D = 0,306 .

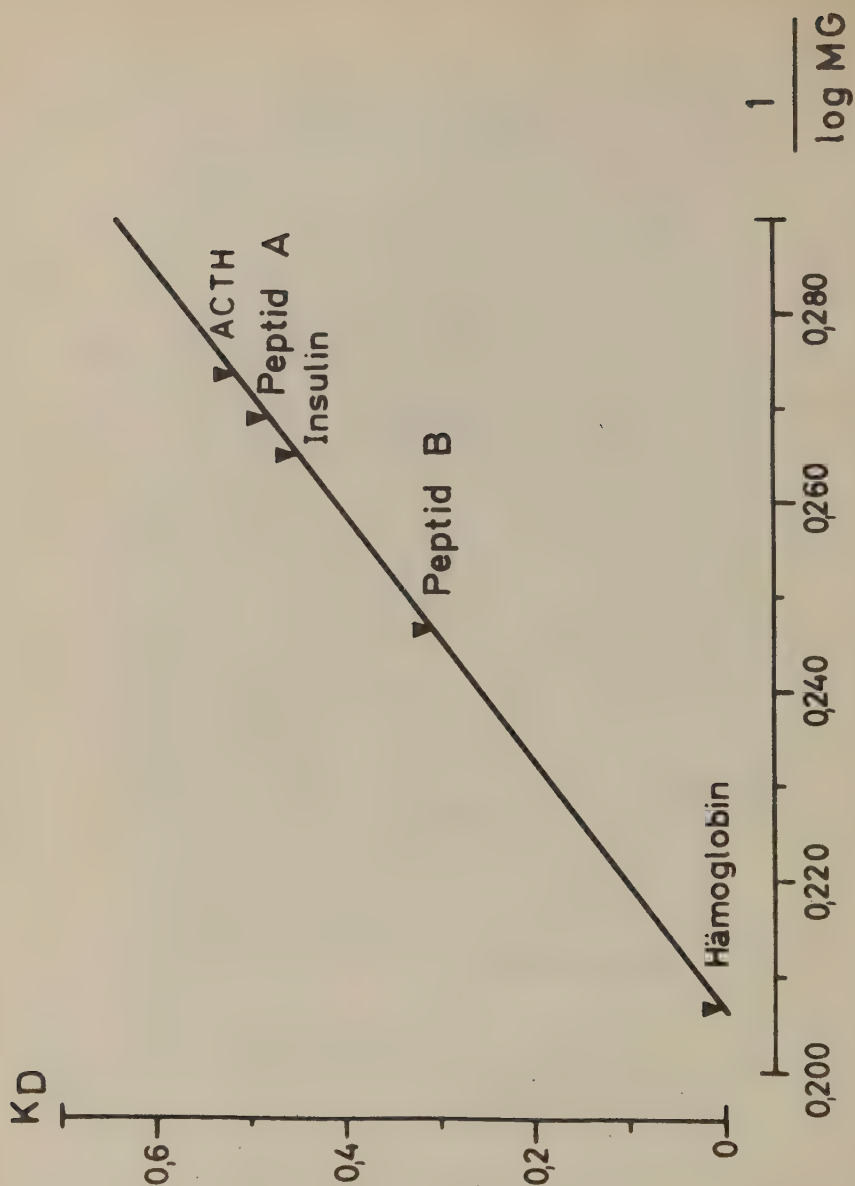


Abb. 16 Molekulargewichtsbestimmung nach SANFELIPPO und SURAK (130) : K_D als Funktion von $1/\log MG$. Neben den Referenzproteinen sind die Peptide eingezeichnet.

Die daraus berechneten Molekulargewichte sind für die

A-Peptide 5300 $\pm$ 530 ,

B-Peptide 11000 $\pm$ 1100 .

H VII 2 Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge

Untersucht wurden bisher Peptid A₁ und Fraktion

K_{3/1} G 50 recho , die Vorstufe von Peptid B₁ .

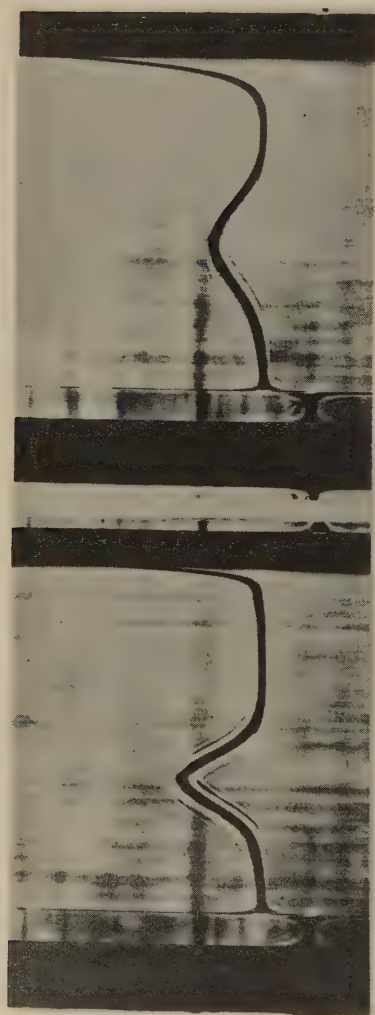
Während der Sedimentations - Geschwindigkeitsläufe zeigten beide Peptide eine einzige symmetrische Gradientenkurve über eine Beobachtungszeit von 150 Minuten.

Danach erwiesen sich Peptid A₁ und die Vorstufe des Peptid des B₁ sedimentationsanalytisch als homogen und frei von sichtbaren Verunreinigungen (Abb. 17) .

Die für verschiedene Konzentrationen bestimmten Sedimentationskoeffizienten sind für Peptid A₁ in Tabelle 6 zusammengestellt. Aus den Werten für drei Konzentrationen (1,5 , 2 , 2,5 %) ergab sich über die Regressionsfunktion bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,988$ eine Sedimentationskonstante von

$$s_0(20,W) = 0,92 \quad .$$

Für Peptid A₁ sind in Tabelle 6 weiterhin die ermittelten scheinbaren Molekulargewichte aufgeführt (6 Einzelbestimmungen, 4 Konzentrationen) . Daraus berechnete



oben



unten

Abb. 17 Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe von Peptid A₁ (oben, Aufnahmen zu den Zeiten $t = 0$ und $t = 64$ min.) und von Fraktion K_{3/1} G 50 rechro (unten, Aufnahmen zu den Zeiten $t = 8$ und $t = 80$ min.) .

Konzentration in %	1	1,5	2	2,5	4	6	8
Sedimentation s_c (20,W)	0,79	0,80	0,77	0,72			
Molekulargewicht M_{app}			5501		5459 5339	4987	5088 4926

Tab. 6 Sedimentationskoeffizienten und Molekulargewichte
(M_{app}) von peptid A_1 bei verschiedenen Konzentra-
tionen.

sich über die zugehörige Regressionsgerade
(Korrelationskoeffizient $r = 0,895$) ein
Molekulargewicht von

$$5600 \pm 250 .$$

Bei der Berechnung des Molekulargewichtes für
Fraktion K_{3/1} G 50 rechro ergab die Auswertung der
Messungen in Form eines $1/MG_{app} = f(c)$ - Diagrammes
keine lineare Kurve, so daß neue Untersuchungen mit
gereinigtem Peptid B₁ abgewartet werden müssen.

H VIII Aminosäurenanalysen

Bisher sind vier Aminosäurenanalysen von Peptid A₁
durchgeführt worden. Aus den Mikromolmengen der
einzelnen Aminosäuren errechnete sich für Peptid A₁
folgende Aminosäurezusammensetzung:

Lys 4,89 , His 2,09 , Arg 2,16 , Asp 4,78 ,
Thr 2,03 , Ser 3,12 , Glu 6,08 , Pro 2,75 ,
Gly 6,94 , Ala 8,78 , Val 3,17 , Meth 1,10 ,
Ileu 1,00 , Leu 4,77 , Tyr 0,62 , Phe 1,25 .

AMINOSÄURENZUSAMMENSETZUNG VON PEPTID A₁

Lysin	5
Histidin	2
Arginin	2
Asparaginsäure	5
Threonin	2
Serin	3
Glutaminsäure	6
Prolin	3
Glycin	7
Alanin	9
Valin	3
Methionin	1
Isoleucin	1
Leucin	5
Tyrosin	1
Phenylalanin	1
Tryptophan	1
	57

Tab. 7 Aminosäurenanalyse des Peptids A₁.

Bei Bestimmung des Tryptophangehaltes nach enzymatischer Hydrolyse ergab sich folgendes Verhältnis der basischen Aminosäuren:

Lys 5,28 , His 1,78 , Arg 1,89 , Try 1,12 .

Die ganzzahligen Werte beider Analysen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

J Immunologie der lipolytisch aktiven Peptide

J I Untersuchungen mit Immunseren gegen Fraktion J und gegen Peptid A₁

Nachdem schon früher ein spezifisch die Lipolyse hemmendes Immunserum gegen Fraktion H aus Schweinehypophysen erhalten worden war (49 , 181) , gelang es, auch gegen die weiter gereinigte Fraktion J und gegen Peptid A₁ selbst ein Immunserum zu erzeugen. Die Untersuchungen wurden mit folgenden Antigenkonzentrationen durchgeführt: Rohfraktion G 15 , J₁ , J , Roh-TSH je 7, die übrigen Fraktionen je 5 g/100 ml.

Zwischen dem Immunserum gegen Fraktion J (AFJS) und den Fraktionen G , J , J_G 50 , Peptid A₁ und der Vorstufe von Peptid A₂ , Fraktion K₁ traten im radialen Doppeldiffusionstest zwei Präzipitationslinien auf, die ohne jegliche Spornbildung ineinander übergingen, und damit immunologische Vollidentität zeigten. Dabei war die Intensität der gebildeten Präzipitationslinien bei Peptid A₁ am schwächsten (Abb. 18) . Die Vorstufen der B-Peptide, die Fraktionen K₃ und J₁ reagierten nicht mit dem Immunserum.

Zwischen AFJS und Roh-TSH und TSH 1 kamen bei verschiedenen Ansätzen jeweils deutlich zwei Präzipitationslinien zur Darstellung, welche mit den Linien der obigen Fraktionen immunologisch identisch waren (L IV 2) . Zwischen AFJS und den Hormonen ACTH, MSH und STH traten keine Kreuzreaktionen auf (L II und III) .

August 9.7.

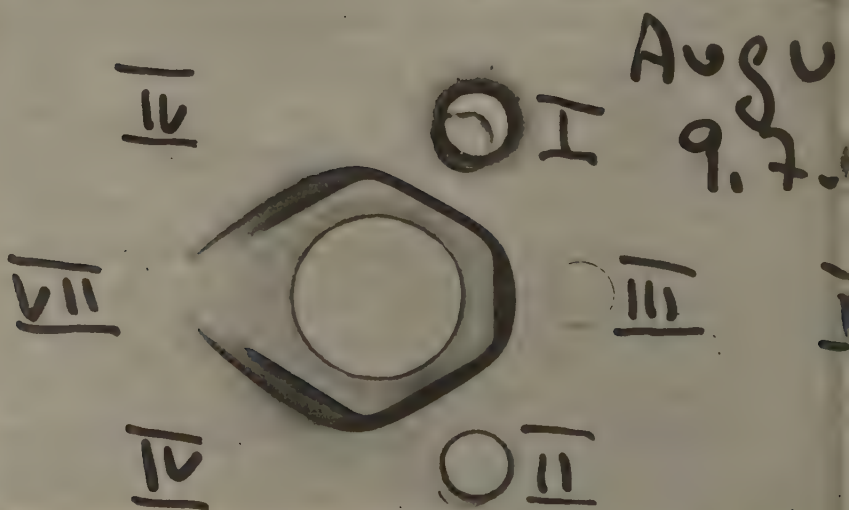
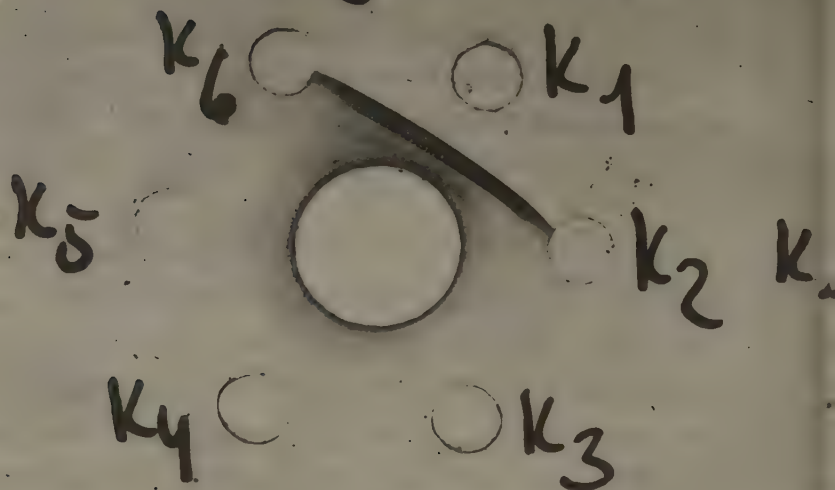


Abb. 18. Nachweis präzipitierender Antikörper des Kaninchen - Anti-Fraktion J-Serums mittels **radialen Doppeldiffusions-** **testes**. Ober: Ansatz gegen die Fraktionen K₁ bis K₆. Unten: Ansatz gegen die Fraktionen G (I), J (II), J_G 50 1 (III), Peptid A₁ (IV) und J₁ (VII).

Immunelektrophoretisch kam es mit AFJS gegen die Fraktionen J , J_G 50 1 , Peptid A₁ , K₁ und Roh-TSH und TSH 1 zu einer parabelförmigen Präzipitationslinie. Dabei waren die Linien der TSH-Fraktionen etwas, die von Peptid A₁ deutlich schwächer. Die Antigene lagen am kathodischen Teil des Objektträgers und zeigten damit die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie in der CAF-Elektrophorese (beide pH 8,6 , H V) .

Zwischen dem Immunserum gegen Peptid A₁ (APAS) und Peptid A₁ und Peptid A₂ trat im radialen Doppeldiffusionstest nur noch eine Präzipitationslinie auf (Abb. 19). Zwischen den beiden Peptiden bestand immunologische Vollidentität. Die lipolytisch inaktive Fraktion J_G 50 1 reagierte mit APAS nicht mehr, während Roh-TSH bzw. TSH 1 ebenfalls mit diesem Immunserum reagierten. In der Immunelektrophorese zeigte sich eine intensiv gefärbte Präzipitationslinie zwischen APAS und den beiden A-Peptiden, die ebenfalls zur Kathode gewandert war.

Die indirekte quantitative Untersuchung der Antikörperkonzentration ergab, daß 1 mg Peptid A₁ 0,1 ml APAS äquivalent ist (K IV , Abb. 19) .

Zwischen den A- und B-Peptiden - ein Immunserum gegen Peptid B₁ haben wir bisher nicht hergestellt - scheinen keine immunologischen Verwandtschaften zu bestehen.

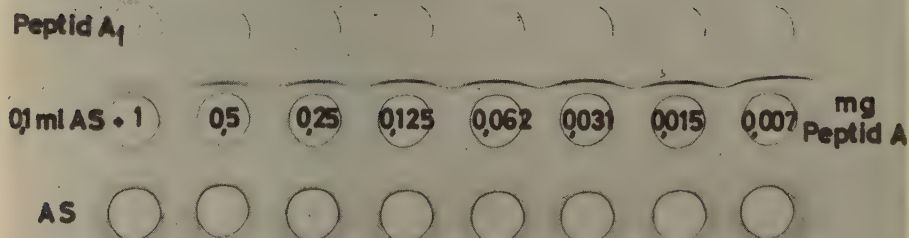
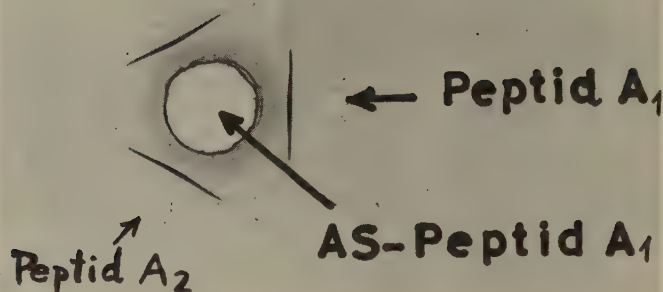


Abb. 19 Oben: Nachweis des präzipitierenden Antikörpers des Kaninchen-Anti-Peptid A₁-Serums mittels radialen Doppeldiffusionstestes. Unten: Indirekte quantitative Bestimmung der Antikörper-Konzentration im Anti-Peptid A₁-Serum; 1 mg Peptid A₁ sind 0,1 ml Immunserum äquivalent.

J II Untersuchungen mit einem Immunserum gegen TSH

Da TSH als einziges Hypophysenhormon eine Kreuzreaktion mit Fraktion J, K_1 und den A-Peptiden zeigte, stellten wir ein Immunserum gegen Roh-TSH her (ATSHS).

Im radialen Doppeldiffusionstest kam es zwischen ATSHS und Roh-TSH und TSH 1 zur Ausbildung von mindestens vier Präzipitationslinien. Das Immunserum reagierte auch mit STH mit mindestens zwei Linien. Keine Reaktionen traten auf mit den Peptiden A und B, MSH und ACTH. Immunelektrophoretisch waren mindestens drei schwache Linien nachzuweisen, deren elektrophoretische Beweglichkeit von der des Peptid A_1 - Antigens unterschiedlich war.

Weitere Ergebnisse der immunologischen Abgrenzung der TSH-Fraktionen von den lipolytisch aktiven Peptiden siehe L IV.

J III Untersuchungen mit einem Antischweineserum

Zwischen Antischweineserum und den Fraktionen G, J, J_1 , $J_G 50 1$, Peptid A_1 und den kartonelektrophoretischen Fraktionen kamen im radialen Doppeldiffusionstest nur bei den Fraktionen G, J, J_1 , $J_G 50 1$, K_4 , K_5 und K_6 zwei schwache Linien zur Darstellung.

Nach der Gelfiltration von Fraktion J sind also immunologisch nur noch in Fraktion $J_G 50 1$ Serumeiweiße nachweisbar. Peptid A_1 und die Vorstufen der B-Peptide

sind frei von Serumeiweißen.

Beim Ansatz von Roh-TSH und TSH 1 gegen Antischweine-
serum bildeten sich mindestens vier intensive
Präzipitationslinien. Eine Verunreinigung mit Serum-
proteinen ist ebenfalls bei dem STH-Präparat, das mit
zwei Linien reagierte, anzunehmen.

K Untersuchte biologische Wirkungen der
lipolytisch aktiven Peptide

Die folgenden Untersuchungen sind im wesentlichen mit Peptid A₁ und seiner Vorstufe Fraktion J durchgeführt worden.

Wir untersuchten:

- die in vivo-Lipolyse bei Kaninchen mit den freien Fettsäuren als Parameter,
- das Verhalten von freien Fettsäuren und freiem Glycerin im Serum von Miniaturschweinen,
- die in vitro-Lipolyse bei verschiedenen Spezies mit Bestimmung der freien Fettsäuren und/oder des freien Glycerins,
- die Hemmung der in vivo-Lipolyse beim Kaninchen durch Immunseren,
- die lipolytische Aktivität in vivo und in vitro von Fraktion J aus Humannypophyzen am Kaninchen.

K I in vivo-Lipolyse beim Kaninchen

Alle Fraktionen, die wir bei der Isolierung der Peptide erhielten, wurden in einer Menge von 0,25 mg subcutan am Kaninchen auf ihre freie Fettsäuren-steigernde Wirkung hin geprüft.

in vivo - Lipolyse beim Kaninchen (FFS)

s.c. Injektion von je 0,25 mg Fraktion in 3 ml

0,9 %iger NaCl-Lösung

Fraktion	0 h mVal/l FFS	1 h mVal/l	Zunahme mVal/l	n
G	0,53 $\pm$ 0,05	2,04 $\pm$ 0,22	1,51 $\pm$ 0,24	11
H	0,59 $\pm$ 0,22	3,28 $\pm$ 0,21	2,69 $\pm$ 0,10	6
J	0,46 $\pm$ 0,07	3,45 $\pm$ 0,23	2,99 $\pm$ 0,20	6
Peptid A ₁	0,38 $\pm$ 0,03	3,66 $\pm$ 0,11	3,28 $\pm$ 0,09	6
K ₁	0,45 $\pm$ 0,07	3,49 $\pm$ 0,10	3,05 $\pm$ 0,05	6
Peptid A ₂	0,37 $\pm$ 0,03	3,44 $\pm$ 0,06	3,07 $\pm$ 0,06	6
K ₃	0,44 $\pm$ 0,06	3,38 $\pm$ 0,13	2,94 $\pm$ 0,11	6
K ₃ /1 G 50 re.	0,52 $\pm$ 0,04	3,62 $\pm$ 0,07	3,10 $\pm$ 0,03	6
Peptid B ₁	0,47 $\pm$ 0,08	3,68 $\pm$ 0,18	3,22 $\pm$ 0,16	6
J ₁	0,38 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,23	1,11 $\pm$ 0,23	6
Peptid B ₂	0,45 $\pm$ 0,07	3,56 $\pm$ 0,12	3,11 $\pm$ 0,11	6
Human- Lipotropin	0,34 $\pm$ 0,07	2,89 $\pm$ 0,10	2,55 $\pm$ 0,10	6

Tab.8 in vivo - Lipolyse der lipolytisch aktiven Fraktionen beim Kaninchen (freie Fettsäuren). Angegeben sind der 0 Stunden-, der 1 Stunden- und der Differenzwert in mVal/l FFS.
 $\bar{x} \pm s_x$.

In Tabelle 8 ist Nüchternwert, 1 Stunden-Wert und die Differenz in mVal/l freie Fettsäuren nach einmaliger Injektion angegeben.

Die Zunahme der lipolytischen Aktivität ist signifikant zwischen Fraktion J und Peptid A₁ (2 P < 0,01) und zwischen Fraktion K₃ und Peptid B₁ (2 P < 0,01) .

K II Das Verhalten von freien Fettsäuren und freiem Glycerin im Serum von Zwergschweinen

Nach einer einmaligen intravenösen Injektion von 0,1 mg/kg Fraktion J stiegen die freien Fettsäuren und das freie Glycerin nach einer Stunde auf den Maximalwert an.

Die Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung hatte keinen Einfluß auf die Lipolyse.

Tabelle 9 Veränderungen von freien Fettsäuren und freiem Glycerin beim Zwergschwein nach Injektion von Fraktion J

Anstieg	Maximum Std.	max. Zunahme, $\bar{x} \pm s_x$, n = 6
Freie Fettsäuren	1	1,11 $\pm$ 0,32 mVal/l
Freies Glycerin	1	0,21 $\pm$ 0,07 mMol/l

K III in vitro - Lipolyse bei verschiedenen Tierspezies

K III 1 Lipolyse mit Bestimmung der freien Fettsäuren

In Abb. 29 sind neben der Spontanlipolyse und der Stimulierung durch 10 μ g Noradrenalin bzw. 1 Internationale Einheit ACTH pro Ansatz die μ Val freie Fettsäuren pro 100 mg Fettgewebe und 3 Stunden als Funktion von 0,01 - 0,1 - 1,0 - 10,0 - 100 μ g/ml zugegebener Fraktion J angegeben (Ratte, Meerschweinchen, Maus, Schwein).

Fraktion J wirkte in vitro lipolytisch bei Kaninchen (45) , Ratte, Maus und Meerschweinchen. Dagegen war eine meßbare Freisetzung von Fettsäuren bei Mensch, Schwein und Zwergschwein nicht zu beobachten.

Die minimal wirksame Dosis Fraktion J bei den verschiedenen Spezies betrug:

Tabelle 10 Minimal wirksame Dosis

			Signifikanzschränke
Kaninchen	0,01 μ g/ml	2 P	< 0,001
Ratte	0,1 "	2 P	< 0,001
Maus	1,0 "	2 P	< 0,001
Meerschweinchen	1,0 "	2 P	< 0,005

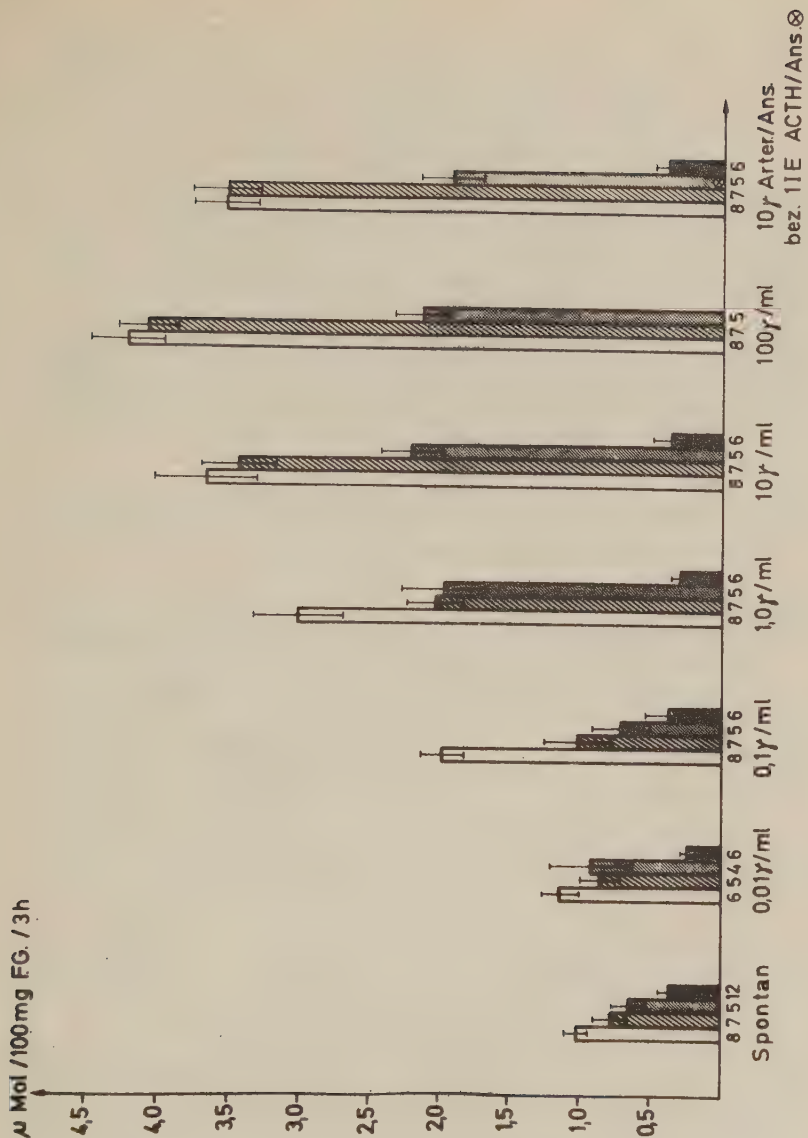


Abb. 21 in vitro - Lipolyse (in uVal FFS , 100 mg Fettgewebe x 3 h) nach verschiedenen Dosen Fraktion J bei Ratte (weiß), Maus (gestrichelt), Meerschweinchen (punktiert) und Schwein (dunkel). Weiterhin angegeben ist die Spontanlipolyse und die Noradrenalin / ACTH - Stimulierung.

n = Zahlen unter Abzisse , $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

K III 2 Lipolyse mit Bestimmung des freien Glycerins

Im Fettgewebe von Mensch, Schwein und Ratte (Kontroll= tier) wurde zusätzlich die Freisetzung des Glycerins gemessen. Beim Schwein ($n = 6$) trat eine signifikante Erhöhung des freien Glycerins nach Inkubation mit Fraktion J nicht auf. Bei Mensch und Ratte waren signifikante Unterschiede zwischen Spontanlipolyse und Inkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Fraktion J nachzuweisen. (Tabelle 11).

Tab. 11 Glycerinlipolyse in $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg}$ Fettgewebe $\times 1 \text{ h}$ bei Mensch und Ratte, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Mensch	$0,048 \pm 0,002$	$0,059 \pm 0,003$
n = 7	nach 1 h	nach 1 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Fr.J
	2 P < 0,001	
Ratte	$0,333 \pm 0,032$	$1,642 \pm 0,364$
n = 4	nach 1 h	nach 1 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Fr.J
	2 P < 0,05	

K IV Hemmung der in vivo-Lipolyse beim
Kaninchen durch Immuneserum

Mit den Immuneseren gegen Fraktion J und Peptid A₁ (AFJS und APAS) ließ sich durch Vollabsorption die lipolytische Wirkung beider Peptide vollständig aufheben. Im indirekten radialen Diffusionstest nach FEINBERG (50) traten zwischen einem Gemisch von 1 mg Peptid A₁ bzw. Fraktion J und 0,1 ml APAS bzw. 0,15 ml AFJS und Peptid A₁ / Fraktion J bzw. APAS / AFJS keine Präzipitationslinien auf (J I , Abb. 19) .

Bei dem in vivo-Test ließ sich die lipolytische Aktivität von 0,25 mg Peptid A₁ mit 0,05 ml zugemischten APAS aufheben. Bei Fraktion J war das Verhältnis 0,25 mg zu 0,08 ml AFJS.

Tabelle 12 Aufhebung der lipolytischen Aktivität
 von Peptid A₁ mit APAS

Injizierte Substanz	0,25 mg Peptid A ₁ $\bar{x} \pm s_x, n=6$	0,25 mg Peptid A ₁ und 0,05 ml APAS $\bar{x} \pm s_x, n=4$	
Differenz der freien Fettsäuren	3,28 $\pm$ 0,09	0,07 $\pm$ 0,05	mVal/l

K V Die lipolytische Wirkung von Fraktion J aus
Humanhypophysen beim Kaninchen in vivo und
in vitro

Beim Kaninchen wirkte humane Fraktion J sowohl in vivo wie in vitro stark lipolytisch: Nach subcutaner Injektion von 0,25 mg stiegen die freien Fettsäuren um $2,55 \pm 0,10$ mVal/l an (Tabelle 8) .

Bereits bei einer Fraktion J - Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ wurde die Spontanlipolyse von $0,24 \pm 0,19$ (n = 6) auf $0,66 \pm 0,05$ (n = 8) $\mu\text{Val/100 mg}$ Fettgewebe x 3 Stunden signifikant stimuliert ($2 P < 0,001$). Angegeben ist $\bar{x} \pm s_x$.

L Abgrenzung der lipolytisch aktiven Peptide gegenüber anderen Hypophysenhormonen

Da neben den isolierten Peptiden auch ACTH, MSH, STH und TSH eine - allerdings spezie- und zeitlich z. T. verschiedene - fettmobilisierende Wirkung haben, wurde versucht, diese Hormone biologisch, immunologisch und physikochemisch von den Peptiden A und B abzugrenzen.

L I Biologische Tests

Fraktion H, die noch beide Peptide enthaltende über Gelfiltration gereinigte Rohfraktion G, wurde auf den Gehalt von ACTH geprüft (169). Fraktion J, die Vorstufe des Peptides A₁, wurde biologisch bzw. radioimmunologisch auf TSH und STH, Peptid B₁ auf TSH getestet.

Im AsKorbin^{säure}verarmungstest waren weniger als 0,4 ACTH-Einheiten / mg Fraktion nachzuweisen.

In Fraktion J wurde ein STH-Gehalt von unter 10^{-6} mg / mg ermittelt. Der TSH-Gehalt lag unter 10^{-3} internationale Einheiten / mg .

Peptid B₁ hatte einen TSH-Gehalt von unter 10^{-3} internationalen Einheiten / mg .

L II Physikochemische und immunologische Abgrenzung
von ACTH und MSH (Tabelle 13)

Obwohl ACTH und die A-Peptide im Molekulargewicht nur um ca. 1000 differieren, bestanden deutliche Unterschiede im Elutionsvolumen der Gelfiltration (C IV 1 und H VII 1) .

In der CAF-Elektrophorese waren bei ACTH mindestens zwei Banden mit von den Peptiden verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten auszumachen (Abb. 14 B) . MSH ließ sich auf der CAF-Folie färbereich nicht darstellen (Konzentrationen ACTH 7 , MSH bis 10 g/100 ml) .

In der Dünnschichtchromatographie (System 1 , pH 2,1) hatten beide Hormone einen kleineren R_f-Wert als die Peptide - Auftragsmenge je 100 µg.

Immunologisch traten im radialen Doppeldiffusionstest keine Kreuzreaktionen der beiden Hormone mit Peptid A₁ bzw. A₂ auf (J I) .

L III Physikochemische und immunologische Abgrenzung
von STH (Tabelle 13)

STH, das bei der Gelfiltration charakteristischerweise retardiert wurde (120 , siehe Abb. 2 in B V) , hatte ein größeres Elutionsvolumen als die beiden Peptide.

In der CAF-Elektrophorese blieb STH (5 g/100 ml) an der Auftragsstelle liegen.

Eine immunologische Kreuzreaktion mit Peptid A₁ bzw. A₂ war nicht nachweisbar (J I) .

L IV Physikochemische und immunologische Abgrenzung
von TSH

Da Roh-TSH als einziges geprüftes Hypophysenhormon mit den Immunseren gegen Fraktion J bzw. gegen Peptid A₁ eine Kreuzreaktion hervorrief (J I und II) , versuchten wir eine weitere Reinigung dieses kommerziellen TSH-Präparates.

L IV 1 Auftrennung des Roh-TSH in weitere
Unterfraktionen

Schema:	<u>Roh-TSH</u>
	Sephadex G 50
	Sephadex G 10
	<u>TSH 1</u>
	CM-Sephadex C 25
	<u>TSH 1/1</u> <u>TSH 1/2</u>

40 mg Roh-TSH werden in 3 ml Ammoniumbikarbonatpuffer (0,1 M , pH 7,4) gelöst und auf Sephadex G 50 fine chromatographiert: Elutionspuffer 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer (pH 7,4) , Durchflußrate 80 ml/h, Sammel- fraktionen 4,5 ml. Die beiden Hauptpeaks werden getrennt gesammelt: TSH 1 Glas 11 bis 18, TSH 2 Glas 25 bis 35, lyophilisiert und auf einer Sephadex G 10 - Säule entsalzt (TSH 1 Glas 15 bis 18 , Abb. 22 und 23) .

Nach dieser Vorreinigung wird das hormonhaltige TSH 1 (nachgewiesen im biologischen Test , E V) weiter

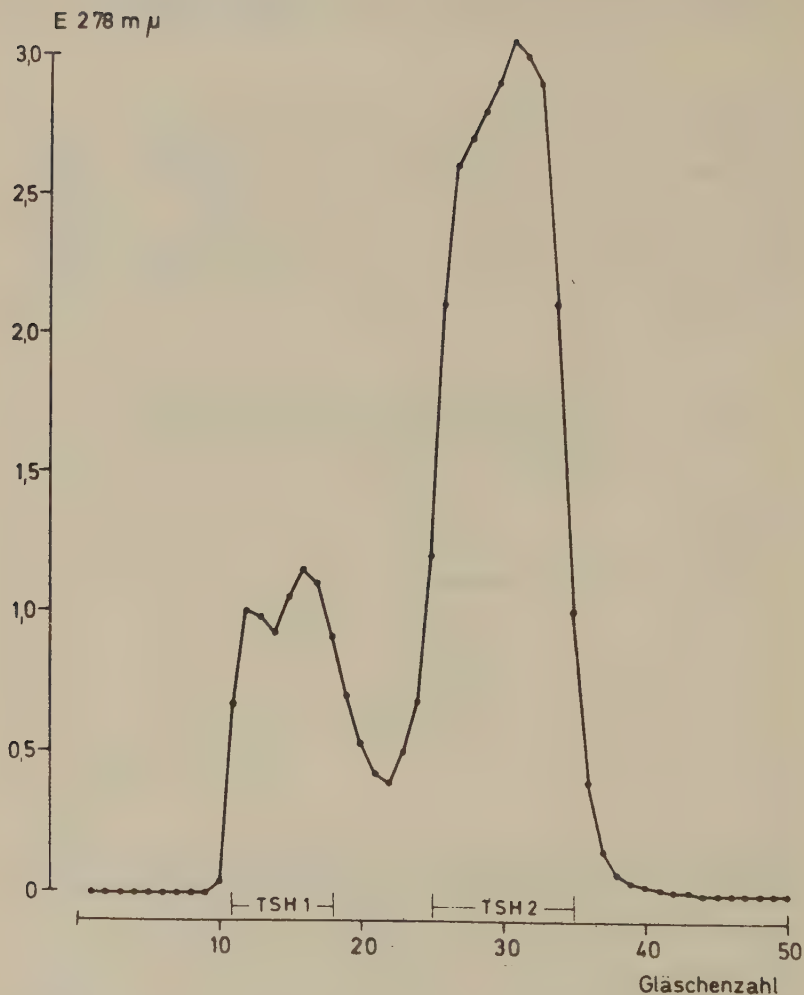


Abb. 24 Säulenchromatogramm von 40 mg Roh-TSH auf Sephadex G 50 fine (39 x 2,2 cm, 0,1 M Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 7,4). Sammelfraktionen 4,5 ml , Durchflußrate 80 ml/h. Extinktion 278 nm — .

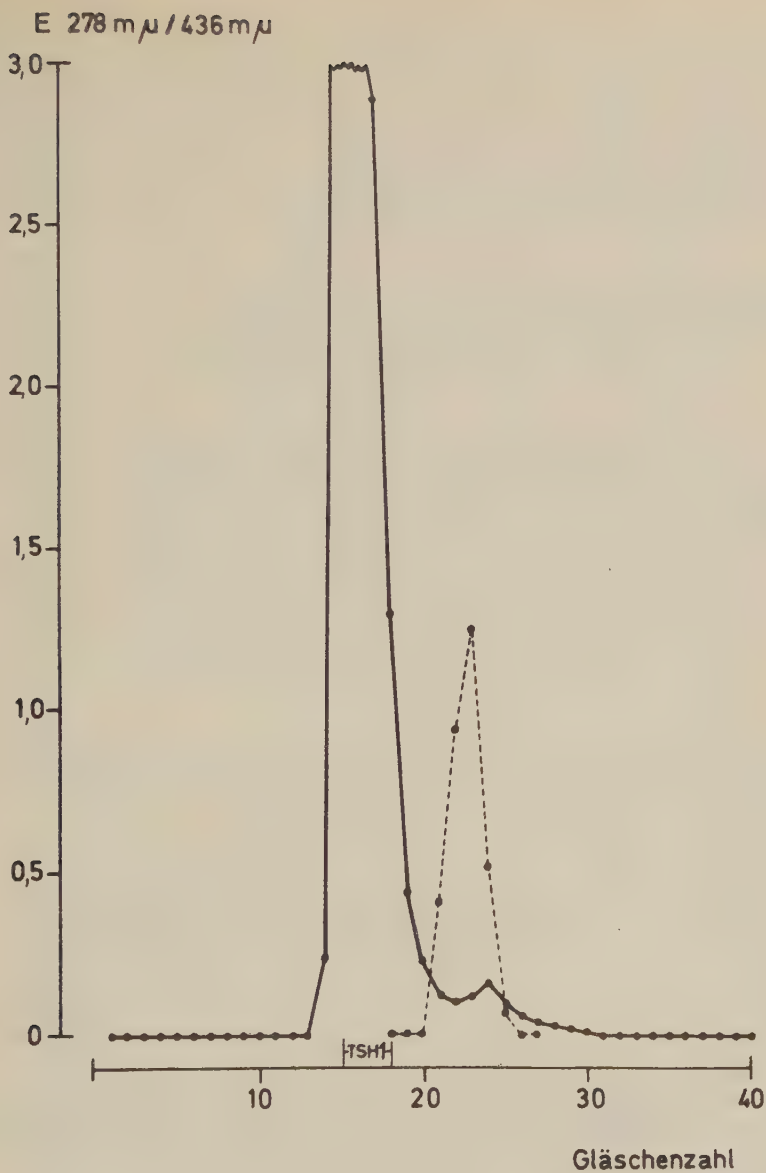


Abb. 22 Säulenchromatogramm von TSH 1 (Auftragsmenge siehe Text) auf Sephadex G 10 (39 x 2,2, Aqua. bidest.).
Sammelfraktionen 3 ml , Durchflußrate 80 ml/h.
Extinktion 278 nm — . Salzpeak (436 nm) --- .

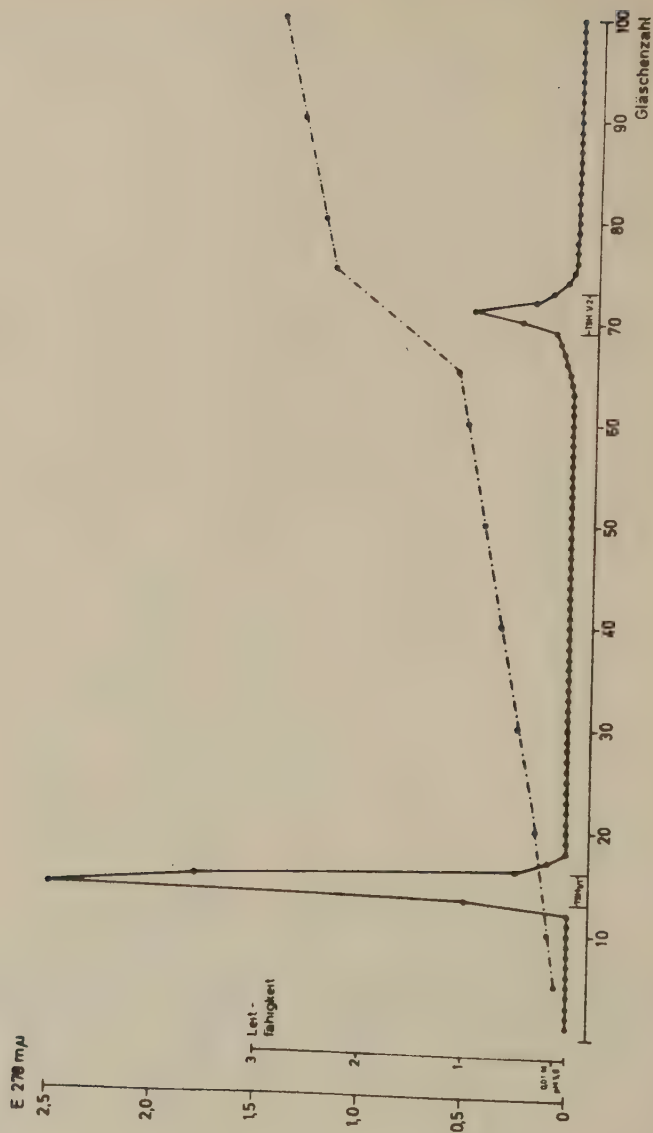


Abb. 23 Säulenchromatogramm von 30 mg TSH 1 auf CM-Sephadex C 25 (39 x 2,2 cm, Äquilibriumierung mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8 , kontinuierliche Gradientenelution mit je 200 ml 0,01 M (pH 5,8) und 0,3 M (pH 7,4) Natriumphosphatpuffer). Sammelfractionen 3,6 ml , Durchflußrate 140 ml/h.

Extinktion 278 nm — , Leitfähigkeit -.-.-

aufgetrennt auf CM-Sephadex C 25 unter den oben angegebenen Bedingungen: TSH 1/1 Maximum Glas 14, TSH 1/2 Maximum Glas 71. Entsalzung durch Dialyse. Die Substanzausbeute aus dem Roh-TSH betrug 65 % TSH 1/1 und 6 % TSH 1/2 (Abb. 24) .

L IV 2 Vergleich der TSH-Fraktionen mit den lipolytisch aktiven Peptiden (Tabelle 13)

In der Dünnschichtchromatographie (System 1, pH 2,1 , Auftragsmenge 500 μ g) blieb der Hauptanteil des TSH 1 an der Auftragsstelle liegen. Eine zweite schwache Bande lag in der Höhe der Peptide A bzw. B . Während TSH 1/1 der ersten Bande entsprach, waren die Rf-Werte von TSH 1/2 und den Peptiden identisch.

Tabelle 13 Physikochemische und immunologische Daten der Peptide A und B und von ACTH, STH, TSH

	Peptid A ₁ /A ₂	Peptid B ₁ /B ₂	ACTH	STH	TSH 1/1	TSH 1/2
Rf-Wert, System 1	0,8	0,8	0,4	Ø	0,0	0,8
CAF-Elpho, Serumglob. bereich	gamma	beta	gamma	wandert nicht	mehrere Banden	Hauptban- de in Höhe von Peptid A
Immun.Reak- tion mit APAS	+	-	-	-	-	+
K _D -Wert	0,481	0,306	0,525	1,092	Ø	Ø

in vivo - Lipolyse der TSH - Fraktionen beim Kaninchen (FFS)

s. c. Injektion der in 3 ml 0,9% NaCl gelösten Fraktion

Fraktion	Menge in mg	0 h mVal/l FFS	1 h mVal/l FFS	Zunahme mVal/l FFS	2 P	n
TSH 1	0,25	kein signifikanter Anstieg		—	—	5
TSH 1	0,75	0,46 ± 0,04	1,28 ± 0,20	0,82 ± 0,22	<0,001	5
TSH 1/1	0,50	kein signifikanter Anstieg		—	—	5
TSH 1/2	0,25	0,47 ± 0,09	1,43 ± 0,25	0,96 ± 0,21	<0,001	5

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Tab. 14 in vivo - Lipolyse der TSH-Fractionen beim Kaninchen (FFS). Angegeben sind der 0 Stunden- , der 1 Stunden- und der Differenzwert in mVal/l FFS, $\bar{x}_1 \pm s_x$.

Die CAF-Elektrophorese von TSH 1 ergab eine Reihe verwaschener Banden über die ganze Folie mit einer intensiv gefärbten Bande in Höhe der A-Peptide. Dieser Bande entsprach der Hauptanteil der Fraktion TSH 1/2 (Abb. 14 B) . Im UV-Spektrum von TSH 1 lagen die Extinktionsmaxima in kürzeren Wellenbereichen als bei den lipolytisch aktiven Peptiden (Abb. 11) .

Im radialen Doppeldiffusionstest zeigte Roh-TSH und TSH 1 eine starke Kreuzreaktion mit AFJS und APAS (J I) . Diese immunologische Verwandtschaft bestand ebenfalls mit TSH 1/2 , während TSH 1/1 nicht mit den Immunseren reagierte. Mit Roh-TSH ließ sich ebenfalls ein Immunserum erzeugen, das aber mit Peptid A oder B nicht reagierte (J II) .

In Tabelle 14 sind die in vivo-Lipolysen der TSH-Fractionen bei Kaninchen eingetragen. Während TSH 1 erst in höherer Dosis (0,75 mg) einen signifikanten Anstieg der freien Fettsäuren hervorrief, war TSH 1/1 nicht lipolytisch aktiv, TSH 1/2 aber schon signifikant aktiv bei einer Dosis von 0,25 mg .

Aus den Befunden könnte geschlossen werden, daß in Roh-TSH und TSH 1 noch eine Peptid A - Kontamination vorliegt, die erst durch die CM-Sephadex C 25 - Chromatographie aus dem eigentlichen TSH (= TSH 1/1) entfernt worden ist.

DISKUSSION

Die Annahme, daß der Energiebedarf des Organismus vorwiegend durch die Mobilisation und Verbrennung von Kohlenhydraten gedeckt wird, ist mit der Erforschung des Fettgewebsstoffwechsels in den letzten 15 Jahren immer mehr fallen gelassen worden. Nach DOLE (39) und GORDON und CHERKES (61) stammt der überwiegende Teil der Energie aus der Verbrennung der Fettsäuren, die, als Triglyceride im Fettgewebe gespeichert, die Transportform der Fette zu den kalorienzehrenden Organen sind. Während alle im Blut zirkulierenden Substrate den Energiebedarf des Organismus nur für zehn Minuten und das in der Leber enthaltene Fett ihn nur für knapp zwei Stunden decken können, lagern bereits in den Fettdepots eines normal ernährten Menschen etwa 100000 bis 150000 Kalorien, die für länger als einen Monat ausreichen (36) .

Neben der Wärmeschutz- und Depotfunktion (Triglyceride haben eine Halbwertszeit von 300 bis 500 Tagen) hat ein Teil (Kompartiment) der Fettzelle einen sehr aktiven Stoffwechsel. 60 bis 80 % des gesamten Kalorienumsatzes des Organismus verlaufen über die aus dem Fettgewebe stammenden freien Fettsäuren - Halbwertszeit zwei bis drei Minuten im Serum (69 , 10 , 86 , 52) . Trotz ihrer relativ geringen Konzentration im Blut können

sie daher einen beträchtlichen Umfang an Verbrennungsenergien zur Verfügung stellen. So gewinnt zum Beispiel der Herzmuskel einen großen Teil seiner Energie aus freien Fettsäuren (11 , 62) .

Wir können also das Fettgewebe als einen Energiespeicher bezeichnen, der die im Organismus in Form von Nahrung zugeführte überschüssige Energie schnell in das Fettgewebe einlagert und ebenso rasch dem Organismus wieder zur Verfügung stellt. Zur Regulation dieses dynamischen Wechselspiels zwischen Lipogenese und Lipolyse stehen dem Organismus eine Reihe von Hormonen zur Verfügung.

M Lipotrope Hormone der Hypophyse ?

Dem Insulin als einzigem lipogenetisch wirksamen Hormon steht eine Reihe auch lipolytisch wirkender Hormone gegenüber. Seit etwa zehn Jahren mehren sich die Berichte über ein spezielles und von den bekannten Hypophysenhormonen differentes lipotropes Hormon der Hypophyse.

Lipidmobilisierende Wirkungen sind beschrieben worden von den Katecholaminen, den Hypophysenhormonen ACTH, MSH, STH, TSH und Vasopressin (Literaturübersichten 175 , 177 , 182) , von Glukagon (155 , 180) und mit uneinheitlichen Ergebnissen von Thyroxin (32 , 54 , 67 , 101 , 59) und den Glucocorticoiden (89 , 78 , 146 , 102) - Thyroxin und den Glucocorticoiden wird eine permissive Wirkung auf die adrenalinstimulierte

Lipolyse zugeschrieben - wie auch von Testosteron (85) .

Untersucht man die in vitro-Lipolyse bei verschiedenen Spezies, so ist keines dieser auch lipidsmobilisierenden Hormone universell wirksam. Eine allgemeine Bedeutung für die Fettmobilisation haben aber offenbar die lipolytisch aktiven Peptide, die "Lipotropine", die bei den folgenden Spezies die in vitro-Lipolyse stimulieren (rechts sind die bei der jeweiligen Spezies nicht wirkenden Hormone angegeben) :

Kaninchen	Katecholamine - STH - TSH
Meerschweinchen	Ø
Ratte	MSH - STH - Vasopressin
Maus	MSH
Mensch	ACTH - STH - TSH - Glucagon

(73 , 123 , 48 , 177 , 129 , 99 , 19 , 170 , 30 ,
siehe unten) .

Ähnlich scheint es mit der in vivo-Lipolyse zu sein, wo auch eine Spezies-spezifische Fettmobilisation nachweisbar ist (siehe unten) . Für eine möglicherweise eigenständige Rolle der lipolytisch aktiven Peptide spricht der rasche Wirkungseintritt - bereits zehn Minuten post injectionem sind freie Fettsäuren und freies Glycerin beim Kaninchen signifikant angestiegen (181) .

Wenn man davon ausgeht, daß einerseits der verzögerte Anstieg der freien Fettsäuren nach STH-Injektion Ausdruck eines (experimentellen) Hungerzustandes ist und stark vom Blutzuckerspiegel abhängt (41 , 177) ,

andererseits nach ASTWOOD (3) den glandotropen Hormonen ACTH und TSH kein regulatorischer Einfluß auf das Fettgewebe unter physiologischen Bedingungen zuzusprechen ist, kann eine direkte und universelle Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch ein besonderes Hypophysenhormon angenommen werden.

Für die Darstellung lipolytisch aktiver Peptide aus Hypophysen verwendete man entweder ACTH-haltige Acetonkonzentrate, die nach säulenchromatographischer Abtrennung des ACTH weiter verarbeitet wurden, oder unmittelbar gefriergetrocknete Hypophysen, aus denen durch fraktionierte Salz- und Acetonfällung das als Rohfraktion G bezeichnete Ausgangsmaterial gewonnen wurde.

Nach BAHNER und SEIFERT (6) , RUDMAN (122 , 130) und TRYGSTAD (171) tritt allerdings bei Acetonlagerung der Hypophysen ein erheblicher Verlust an lipolytischer Aktivität auf.

Aus ACTH-Konzentraten ist bisher LI und Mitarbeitern (12 , 90 , 25 , 91) die Isolierung zweier Lipotropine gelungen (beta- und gamma-Lipotropin, MG 9800 bzw. 5800, beide haben Glutamat als N-terminale Aminosäure, Isolierung aus Schaf- und Rinderhypophysen, in der Aminosäuresequenz keine Spezies-Unterschiede) .

Sie fanden übereinstimmende Teilsequenzen in ACTH, MSH und Lipotropin und nahmen für diese Hormone die Synthese aus einem großen Stammpolypeptid an (24) .

GRAF et al. (64 , 65) konnten mit der gleichen Methodik

Analyse und Molekulargewicht für zwei Lipotropine aus Schweinehypophysen bestätigen, während RYSCHKA und CHOCHLOW (134) , auf der von ASTWOOD et al. (4) angegebenen Methode aufbauend, ein Lipotropin mit einer anderen Aminosäurenanalyse fanden (MG 6500 bis 7000, Methionin N-terminal, Isolierung aus Schaf-, Rind- und Schweinehypophysen, in den Analysen Speziesunterschiede) . Zwei lipolytisch aktive Peptide aus Schweinehypophysen haben in neuerer Zeit RUDMAN et al. (126) darstellen können (MG ca. 5500 bzw. 8900) .

Wir haben versucht, mit dem Rohextrakt G als Ausgangssubstanz zwei lipolytisch aktive Peptide vom Schwein mit neuen Methoden zu isolieren. Die Auftrennung der Rohfraktion auf CM-Sephadex C 25 führte zunächst über die adsorbierte Fraktion J zum Peptid A₁ , das sich in den folgenden Kriterien als einheitlich erwies: Säulen- und Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese einschließlich Acrylamidgelelektrophorese, Ultrazentrifuge und radialer Doppeldiffusionstest. Durch die kartonelektrophoretische Auftrennung der Fraktion G wurde weiterhin Peptid A₂^{erhalten} V, das physikochemisch (UV-Spektrum, Säulen-, Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese) und immunologisch mit Peptid A₁ identisch war.

Die A-Peptide aus Schweinehypophysen stimmen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes von 5600 und der Aminosäureanzahl von 57 gut mit dem gamma-Lipotropin von CHRETIEN und LI (25) überein. In der Aminosäurenanalyse bestehen Differenzen. RYSCHKA und CHOCHLOW (134)

	Li et al. 8 - LPH Schaf/Rind	Csch et al. 8 - LPH Mensch	Graf u. Csch 8 - LPH Schwein	Li et al. γ - LPH Schaf	Graf et al. γ - LPH Schwein	Ruszk u. Chuchlow Lipotropin Rind	Ruszk u. Chuchlow Lipotropin Schaf	Ruszk u. Chuchlow Lipotropin Schwein	Schwandt et al. Peptid A₁ Schwein
Lysin	10	9	10	4	4	4	5	5	5
Histidin	2	2	2	1	1	1	1	1	2
NH ₂	3	-	-	4	-	5	6	5	-
Arginin	5	5	4	4	3	4	3	3	2
Aspartat	4	6	5	2	3	4	6	5	5
Threonin	4	4	3	1	-	2	3	2	2
Serin	5	5	3	3	1	3	5	3	3
Glutamat	16	13	14	13	11	10	10	10	6
Prolin	5	6	9	4	8	5	4	4	3
Glycin	3	11	3	5	5	5	4	4	7
Alanin	13	3	14	11	13	8	5	9	9
Cystin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valin	2	3	3	1	1	2	2	3	3
Methionin	2	2	2	1	1	1	1	1	1
Isoleucin	1	1	1	-	-	1	1	1	1
Leucin	6	8	5	4	3	4	5	5	5
Tyrosin	3	3	3	2	2	2	2	2	1
Phenylalanin	3	3	3	1	1	1	2	1	1
Tryptophan	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gesamt	90	90	90	58	58	58	60	60	57
Molekulargewicht (Ultrazentrifuge)	9.900		11.000	5.800		ca. 7.000	ca. 7.000	ca. 7.000	5.600 ± 280

Tab. 15 Literaturzusammenstellung der bis jetzt vorliegenden Lipotropinaminosäurenanalysen.

erzielten auch bei Nachvollziehung der LI-Methodik keine Analysenübereinstimmung, sondern bestätigten ihre eigenen Ergebnisse. Die Differenzen beim Vergleich der Aminosäureanalysen (Tabelle 14) können sowohl methodisch wie auch auf Grund der Speziesunterschiede bedingt sein.

Die Peptide B₁ und B₂ , die wir durch Kartonelektrophorese aus den Fraktionen G und J₁ isolieren konnten und die ebenfalls miteinander identisch zu sein scheinen (geprüfte Kriterien: UV-Spektrum, Säulen-, Dünnschichtchromatographie, CAF-Elektrophorese) , liegen mit ihrem bis jetzt von uns bestimmten Molekulargewicht von etwa 11000 in der Größenordnung der bis jetzt bekannten beta-Lipotropine. Peptid B₁ ist einheitlich in der Säulen- und Dünnschichtchromatographie, in der CAF- und Acrylamidgelelektrophorese.

Auf Dowex 4X2 wird Peptid B₁ im Gegensatz zu den nicht adsorbierten A-Peptiden erst mit der höhernormalen Essigsäure eluiert. Analog verhalten sich die Peptide von ASTWOOD et al. (4) und RYSCHKA und CHOCHLOW (134) .

In der Acrylamidgelelektrophorese (pH 4,5) wandern Peptid A₁ / A₂ schneller als die B-Peptide. Analoge elektrophoretische Beweglichkeiten sind von den Lipotropinen von LI und Mitarbeitern (12 , 90 , 25 , 91) bekannt. In der CAF-Elektrophorese (pH 8,6) ist die elektrophoretische Beweglichkeit der Peptide B₁ / B₂ größer als die aller bekannten Hypophysenhormone. Auch das Lipotropin von RYSCHKA und CHOCHLOW (134) wandert in der Stärkegelelektrophorese (pH 8) schneller als die

anderen Hypophysenhormone, was für ein Peptid der größeren Gewichtsklasse spricht.

Lipolytisch aktive Peptide aus Humanhypophysen sind bisher weitgehend charakterisiert worden von TRYGSTAD (172) , CSEH et al. (30) und uns. Nach den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich bei unserer bisher gewonnenen Humanfraktion J um die Vorstufe eines Peptides A. Ein ähnliches Chromatogramm auf CM-Sephadex C 25 erhielten CSEH et al. (30) bei der Herstellung von Humanlipotropin aus Acetonkonzentraten nach der Methode von BIRK und LI (12) . Mit einem Molekulargewicht von etwa 11000 und 90 Aminosäuren charakterisierten sie aber die Substanz als ein beta-Lipotropin.

Eine Kontamination mit anderen Hypophysenhormonen mit lipolytischer Wirkung ist nach den bisherigen Untersuchungen nicht wahrscheinlich. Weder ACTH noch TSH oder STH waren im biologischen Test bzw. radioimmunologisch in Fraktion H bzw. J (Vorstufen von Peptid A und B) und in Peptid B₁ nachweisbar. Weiterhin ließen sich physikochemische Unterschiede zwischen den genannten Hormonen und den lipolytisch aktiven Peptiden aufzeigen. Neben unterschiedlichen Elutionsvolumina in der Gelfiltration konnten die Hormone insbesondere in der CAF-Elektrophorese differenziert werden. Während STH, wie auch von BLÜM (13) festgestellt wurde, nicht wandert (pH 8,6) und ACTH andere elektrophoretische Beweglichkeiten seiner Banden hat, ist im TSH, das sich von den A- und B-Peptiden dünnenschichtchromatographisch und im UV-Spektrum

unterscheidet, eine Verunreinigung mit Peptid A anzunehmen, die auch die antigenetische Verwandtschaft der beiden Peptide erklären könnte. Säulenchromatographisch konnten wir vom kommerziellen TSH einen lipolytisch aktiven Anteil abtrennen, der allein mit dem Immuns serum gegen Fraktion J bzw. gegen Peptid A₁ reagiert und in der Elektrophorese wie Peptid A wandert. Eine Kontamination ihrer TSH-Fraktion mit einer lipolytisch wirksamen Fraktion nehmen auch BURNS et al. (18) an.

In Abb. 3 sind die bisherigen Hauptgewinnungswege der lipolytisch aktiven Peptide mit dicken Pfeilen gekennzeichnet. Da sich bisher säulenchromatographisch (Dowex 1X2) aus Fraktion J₁ kein höher aktives Peptid B herstellen ließ, scheint die Kartonelektrophorese ein notwendiger Reinigungsschritt zu sein. Für die Peptidgewinnung bieten sich einmal die elektrophoretische Auftrennung des Rohextraktes G und eine säulenchromatographische Aufarbeitung zu Peptid A₂ und Peptid B₁ oder eine direkte säulenchromatographische Peptid A₁ - Gewinnung und eine kartonelektrophoretische Peptid B₂ - Gewinnung aus Fraktion J₁ an.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es sich bei den isolierten lipolytisch aktiven Peptiden um eigenständige Substanzen der Hypophyse handelt, die sich vom somatotropen und den glantotropen Hormonen der Hypophysenvorderlappens unterscheiden.

N Lipolytische Wirkungen

Die Stoffwechselwirkungen eines Hormons können einmal durch die Exstirpation der betreffenden endokrinen Drüse erfaßt werden. Bei hypophysektomierten Ratten ist zwar die Lipolyse deutlich vermindert und durch Hunger oder Katecholamine nur schwach stimulierbar (48) . Da aber bei diesem Eingriff auch die anderen Hormone ausfallen, ist anhand der lipolytischen Wirkung das Wegfallen von speziellen lipolytisch aktiven Peptiden nicht zu belegen. Weiterhin ergeben in vivo- und in vitro-Untersuchungen Aufschluß über die beeinflussten Stoffwechselvorgänge, wobei sie aber dadurch erschwert werden, daß nicht nur zwischen den verschiedenen Spezies die Ansprechbarkeit auf lipidmobilisierendes Hormon different ist, sondern sich auch Leber und Fettgewebe unterschiedlich am Fettstoffwechsel beteiligen (58 , 70 , 34 , 77 , 60 , 129 , 56 , 149) .

Wir haben die lipolytische Aktivität bei möglichst vielen Spezies untersucht, mußten uns aber bei der Erfassung der in vivo-Lipolyse auf das Kaninchen als Standardversuchstier und das Miniaturschwein beschränken. Das Schwein wurde deshalb als zweite Spezies ausgewählt, weil die Peptide A und B aus Schweinehypophysen gewonnen wurden und zwischen Schwein und Mensch Stoffwechselübereinstimmungen bestehen (31) .

Der rasche Anstieg der freien Fettsäuren und des freien Glycerins erklärt sich aus der Aktivierung der hormonempfindlichen Triglyceridlipase (181) über das 3',5'-AMP - System (siehe unten) . Dieses die Lipolyse limitierende Enzym, auf das auch die oben genannten fettmobilisierenden Hormone einwirken, wird sehr schnell zu 80 bis 100 % in die aktive Form übergeführt (118 , 119). Die Umstellung auf die Fettsäureverbrennung wird evident durch eine negative arteriovenöse Differenz der freien Fettsäuren im Fettgewebe und eine positive in der Leber, die Fettzunahme in der Leber, einen verminderten Respirationskoeffizienten und die auftretende Ketonämie (87 , 130 , 71 , 74 , 171) .

Nach Injektion bzw. Inkubation mit lipolytisch aktiven Hypophysenextrakten fanden KELLNER et al. (79) und LANDOLT und ASTWOOD (84) außerdem eine Inhibition der Lipoproteinlipase im Plasma bzw. Fettgewebe von Kaninchen. Dieses Enzym, dessen Hauptfunktion die Assimilation der Nahrungsfette ins Fettgewebe ist, wurde auch bei Hunger (vermehrte Lipolyse) erniedrigt gefunden (15) . OLENEWA (105) stellte allerdings nach längerer Behandlung von Fettsüchtigen mit dem Hypophysenextrakt Adiposin eine Aktivierung der Fettgewebs-Lipoproteinlipase fest. In der akuten Lipolyse ist wohl keine Aktivierung der Lipoproteinlipase anzunehmen, weil nach Injektion lipidmobilisierender Extrakte beim Kaninchen der Triglyceridspiegel erst nach längerer

Zeit als Ausdruck der Reveresterung der mobilisierten freien Fettsäuren ansteigt.

Bei der durch das lipotrope Peptid aktivierten Lipolyse findet zusätzlich eine Hemmung der Lipogenese im Fettgewebe über eine verminderte Bereitstellung von reduziertem Nicotinadenindinucleotidphosphat (oxydativer Pentoseweg) und alpha-Glycerophosphat statt (Übersicht 143) .

Während wir bei Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen und Maus bei den in vitro-Lipolysen einen signifikanten Anstieg der freien Fettsäuren im Medium nach Zugabe von Fraktion J feststellen konnten, war beim Menschen nur eine vermehrte Glycerinfreisetzung nachzuweisen. Da die freien Fettsäuren in unterschiedlichem Maße in Abhängigkeit vom Glucoseabbau der Reveresterung unterliegen, ist das freie Glycerin, das im Fettgewebe nicht verestert werden kann, ein empfindlicheres Maß für die induzierte Lipolyse (174 , 175) . Bei der Ratte stieg das Glycerin aber im Vergleich zum Menschen wesentlich höher an (Ratte 1 : 5 , Mensch 1 : 1,25) .

TRYGSTAD (172) und CSEH et al. (30) fanden nach Inkubation mit lipidmobilisierenden Fraktionen aus Humanhypophysen auch eine merkliche Erhöhung der freien Fettsäuren im Medium. Mit Schweinefraktionen konnten die letzteren Autoren ebenfalls keine signifikante Lipolyse erzielen (29) . BURNS et al. (18) und BURNS und LANGLEY (19) haben wie wir das freie Glycerin an isolierten Fettgewebszellen von Ratte und Mensch unter Verwendung von lipidmobilisierenden Humanfraktionen

gemessen und die gleichen Ergebnisse erhalten. Nach RUDMAN und DEL RIO (125) verhalten sich inkubiertes Fettgewebe und inkubierte freie Fettzellen identisch gegenüber lipolytisch aktiven Hormonen.

Das schwache Ansprechen des subcutanen Fettgewebes des Menschen könnte auf eine relative Unempfindlichkeit der hormonsensitiven Triglyceridlipase auf das 3',5'-AMP-System zurückgeführt werden. Nach HAMOSH et al. (66) hat das subcutane Fettgewebe des Menschen größere Bedeutung als Wärmeschutz- und Depotorgan im Gegensatz zum metabolisch aktiveren omentalen Fettgewebe. Weiterhin steht dem ausgewachsenen Menschen mit einer langsamen Fettsäuresyntheserate aus Glucose die Ratte mit einem raschen Wachstum und einer positiven Kalorienbilanz gegenüber (98) . Beim Schwein wurden weder freies Glycerin noch freie Fettsäuren vermehrt durch Fraktion J freigesetzt. Die durch diese Fraktion induzierte Lipolyse beim Zwergschwein in vivo zeigt jedoch, daß in vitro-Untersuchungen nicht den Bedingungen des intakten Organismus entsprechen.

0 Mögliche Wirkungsweise und Bedeutung der lipolytisch aktiven Peptide

Lipolysehemmer wie lipidmobilisierende Hormone wirken über den "second messenger" 3',5'-AMP (165) und können über das Adenylcyclase - Phosphodiesterase - System dessen Gewebsspiegel regulieren (Übersicht 166 , 20) . Durch das zyklische Nukleotid werden Schlüsselenzyme des Stoffwechsels, die sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Zustand befinden, rasch aktiviert, wie wir es oben am Beispiel der hormonsensitiven Triglyceridlipase gesehen haben (162, 116 , 163 , 118 , 112 , 159) .

Um die Wirkungsweise der lipotropen Peptide zu charakterisieren, wurde von unserer Arbeitsgruppe der Einfluß von Fraktion J auf die Aktivität der Phosphodiesterase im Fettgewebe von Mensch, Schwein und Ratte untersucht (43 , 100 , 38 , 83) . Während beim Schwein entsprechend der negativen Glycerinlipolyse keine Änderung der PDE-Aktivität nachweisbar war, erfolgte bei Mensch und Ratte eine signifikante Hemmung der PDE durch Fraktion J.

In Tabelle 1b sind die bisher bekannten Wirkungsmechanismen der Hormone auf das 3',5'-AMP - System zusammengestellt (Übersicht 144) . Auch Fraktion J, die Vorstufe von Peptid A₁ , scheint durch eine Phosphodiesterase-Hemmung in dieses System und damit in den Intermediarstoffwechsel einzugreifen. Eine zusätzliche Adenylcyclase-Aktivierung ist wahrscheinlich (140) .

Adenylcyclase				Phosphodiesterase		
	Aktiviert	Gehemmt	Induziert	Gehemmt	Induziert	Supprimiert
Insulin Prostaglandine		+ +			+ +	
Katecholamine ACTH Fraktion } Glucagon	+ + (+) +				+	
Glucocorticoide Thyroxin			+			+

Tab. 16 Wirkungsmechanismen verschiedener Hormone auf das 3',5'-AMP - System.

Größeren Einblick in die Bedeutung der verschiedenen lipolytisch aktiven Hormone für den Fettstoffwechsel geben Hemmversuche mit Sympathicolytica. Nach STOCK und WESTERMANN (158) kann eine adrenerge (Noradrenalin kompetitiv hemmbar durch beta-Sympathicolytica) und nicht adrenerge (Polypeptide) Mobilisierung der freien Fettsäuren angenommen werden. Da der Sympathicotonus nach BRODIE et al. (16) und STOCK und WESTERMANN (158) bei hungernden oder diabetischen Ratten ohne wesentlichen Einfluß auf den Fettsäuren-Spiegel ist, hat das Neurohormon Noradrenalin nur eine Bedeutung für "Stress"-Situationen zur Energiemobilisation (Kälteschockversuche, 57 , 158) . Gleiches gilt für das Adrenalin des Nebennierenmarkes.

Schwieriger ist es, ACTH und die lipotropen Peptide gegeneinander abzugrenzen. ACTH wirkt nicht fettmobilisierend durch Freisetzung von Katecholaminen (139 , 108) , sondern durch direkte Einwirkung auf die Adenylcyclase. Eine Hemmung tritt erst bei hohen Dosen eines beta-Sympathicolyticums ein (158) . WESTERMANN und STOCK (183) konnten weiterhin nachweisen, daß die lipolytische Aktivität des ACTH, wenn auch erniedrigt, unabhängig vom Cortisolspiegel ist. Trotzdem ist anzunehmen, daß sich der Organismus eines besonderen lipotropen Hormons bedient, das, nur stoffwechselaktiv, keine glandotropen Wirkungen hat.

Versuchen wir also, die die Lipolyse stimulierenden Hormone voneinander abzugrenzen, stehen auf der einen Seite die Katecholamine als Überträgerstoffe des sympathischen Nervensystemes und auf der anderen Seite die lipotropen Hormone der Hypophyse, die eine Bedeutung für die rasche Energiemobilisierung aus dem Fettgewebe haben..

Entsprechend können wir für den zweiten Energiespeicher, dem Leberglykogen, dem Neurohormon Noradrenalin das Pankreashormon Glukagon für die rasche Zuckerbereitstellung gegenüberstellen. Da Fett-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel eng miteinander zusammenhängen, ist Hyperglykämie mit einer Triglyceridspaltung verbunden - nach Glukagoninjektion fallen die freien Fettsäuren aber bereits nach zehn Minuten wieder ab (180) . Ebenso zieht eine durch lipotropes Peptid bedingte Lipolyse einen Anstieg des Zuckers nach sich, der aber wesentlich geringer als nach einer Glukagongabe ist (180 , 181) .

Während die sympathische Innervierung der Energiespeicher als Neuerwerbung in der Evolution eine optimale Adaptation an die Umwelt ("Stress") ist, stellen die Polypeptide aus Hypophyse und Pankreas je nach Bedarf und der augenblicklichen Stoffwechselsituation durch Bereitstellung von freien Fettsäuren und Glucose Energie im ausreichenden Maße zur Verfügung.

P Immunologie der lipolytisch aktiven Peptide

Mit den Immunseren gegen Fraktion J und Peptid A₁ ließ sich ebenso wie mit dem Immunserum gegen Fraktion H (49) die lipolytische Aktivität in vivo aufheben. Mit den B-Peptiden scheinen keine immunologischen Verwandtschaften zu bestehen. Ein spezifisches Immunserum gegen beta-Lipotropin konnten LOHMAR und LI (92) erzeugen. Eine Kreuzreaktion der A-Peptide mit anderen Hypophysenhormonen lag nur mit TSH vor, was nach unseren Befunden durch eine Kontamination mit Peptid A im verwendeten TSH-Präparat erklärt werden könnte. Das mit diesem TSH erzeugte Immunserum zeigte charakteristische Unterschiede zu den Immunseren der lipotropen Fraktionen. Ein immunoelektrophoretisch ähnliches TSH-Antigen fanden PASCASIO und SELENKOW (109) und BLUM (13), die mit ihren TSH-Präparaten ebenfalls nur schwache präzipitierende Antikörper erzeugen konnten.

Die Anzahl der Präzipitationslinien unterrichtet über die Mindestzahl der reagierenden Antigen-Antikörper-Komplexe (5). Während bei den Ansätzen gegen AFJS immer zwei Linien auftraten, reagierte das Immunserum gegen das Peptid A₁ selbst nur noch mit einer Präzipitationslinie. Die Intensitätsabnahme der Präzipitationslinien von AFJS bei Ansatz gegen höher gereinigte lipolytisch aktive Fraktion - bei gleichbleibender Intensität bei Ansatz gegen den lipolytisch inaktiven Anteil von Fraktion J, Fraktion J_G 50 1 - spricht dafür, daß die antigenetische Eigenschaft von Fraktion J

nicht nur durch das darin enthaltene Peptid A₁ bedingt ist. Die Zunahme des Antigen-Antikörper-Quotienten bei Hemmung der in vivo-Lipolyse ist dementsprechend ein Hinweis auf die größere Spezifität des Immunserums gegen Peptid A₁.

Eine relativ schwache Antigenität ihres Humanlipotropins (172) stellten NORMAN und TURTER (104) fest, die keine spezifischen Antikörper bei Kaninchen und Meerschweinchen, sondern einen hohen STH-Antikörpertiter erhalten haben. Die Autoren führen diese Befunde auf die zu schwache Antigenität ihres Lipotropins (MG 2100) und eine noch vorhandene STH-Verunreinigung zurück.

Unsere Ergebnisse beweisen aber, daß auch mit dem kleinen lipotropen Peptid (MG unter 6000) ein spezifisches Immunserum hergestellt werden kann. Somit bleibt die Möglichkeit einer radioimmunologischen Nachweismethode, die klinisch von Bedeutung sein könnte, offen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden mehrere neue Methoden zur Gewinnung von lipotropen Polypeptiden aus Schweine- und Humanhypophysen beschrieben. Das Vorhandensein zweier verschieden großer lipolytisch aktiver Peptide - Peptide A und B - auch in der von BONSNES und WHITE (14) beschriebenen Fraktion G wird nachgewiesen. Während sich das kleinere Peptid A₁ aus Fraktion G von Schweinehypophysen säulen= chromatographisch isolieren läßt, können ein Peptid A₂ und die großen Peptide B₁ und B₂ durch präparative Elektrophorese dargestellt werden. Aus Humanhypophysen wird Fraktion J, ein noch nicht rein isoliertes Peptid A , präpariert.

Peptid A₁ und B₁ sind einheitlich in der Dünnschicht= chromatographie, CAF-Elektrophorese, Acrylamidgelelektrophorese und Ultrazentrifuge. Peptid A₁ hat ein Molekulargewicht von 5600 und einen Gehalt von 57 Aminosäuren. Peptid B₁ hat ein Molekulargewicht von etwa 11000 .

Von den anderen Hypophysenhormonen werden die lipolytisch aktiven Peptide physikochemisch und biologisch abgegrenzt. Im TSH der Fa. Organon, München, wird die Möglichkeit einer Kontamination mit Peptid A erörtert.

Die lipolytische Wirksamkeit der Peptide wird in vivo und in vitro an verschiedenen Spezies geprüft. Es zeigt sich, daß die lipotropen Peptide im Gegensatz zu den übrigen Hypophysenhormonen offenbar eine universelle

lipidmobilisierende Wirkung haben. Während bei Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen und Maus in vitro eine signifikante Freisetzung der freien Fettsäuren festzustellen ist, ist beim Menschen nur eine Glycerinlipolyse nachzuweisen. Die in vivo-Lipolyse läßt sich außer beim Kaninchen auch beim Zwergschwein stimulieren. Ein Eingreifen der lipotropen Peptide über das zyklische Nukleotid 3',5'-AMP in den Intermediärstoffwechsel wird diskutiert.

Aus den dargelegten Ergebnissen können die isolierten Substanzen als eine eigenständige, stoffwechselwirksame Gruppe von Hypophysenpeptiden angesehen werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 ALM, R.S., R.J.P. WILLIAMS and A. TISELIUS
 Gradient Elution Analysis
 Acta Chem. Scand. 6, 826 (1952)
- 2 ANSELMINO, K.J. und E.HOFFMANN
 Das Fettstoffwechselhormon des
 Hypophysenvorderlappens
 Klin. Wschr. 10, 2380 (1931)
- 3 ASTWOOD, E.B.
 The Pituitary Gland and the Mobilization of Fat
 aus: Handbook of Physiology 5, Adipose Tissue
 (ed. A.E. RENOLD and G.F. CAHILL) 1965
- 4 ASTWOOD, E.B., R.J. BARRETT and H. FRIESEN
 Two Metabolically Active Peptides from
 Porcine Pituitary Glands
 Proc. Nat. Acad. Sc. 47, 1525 (1961)
- 5 BACKHAUSZ, R.
 Immunodiffusion und Immunelektrophorese
 Grundlagen, Methoden und Ergebnisse
 Fischer, Jena 1967
- 6 BAHNER, F. und P. SEIFERT
 Die Bestimmung des ketogenen
 Hypophysenvorderlappenhormons
 Z. ges. exp. Med. 115, 603 (1950)

- 7 BARROLIER, J., J. HEILMANN und E. WATZKE
 Beitrag zur Aminosäurenbestimmung auf
 Papierchromatogrammen
 Hoppe Seyler's Zschr. physiol. Chem. 309, 219 (1957)
- 8 BARTLETT, G.R.
 Phosphatide (Phosphorus Assay in Column
 Chromatography)
 J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
- 9 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK,
 H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER
 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-
 Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchen=
 muskulatur in einem Arbeitsgang
 Z. Naturforschg. 8 b, 555 (1953)
- 10 BIERMAN, E.L., J. SCHWARTZ and V.P. DOLE
 Action of Insulin on Release of Fatty Acids
 from Tissue Stores
 Amer. J. Physiol. 191, 359 (1957)
- 11 BING, R.J., A. SIEGEL, J. UNGAR and M. GILBERT
 Metabolism of the Human Heart. II Studies on
 the Fat, Ketone and Amino Acid Metabolism
 Amer. J. Med. 16, 504 (1954)
- 12 BIRK, Y. and C.H. LI
 Isolation and Properties of a New, Biologically
 Active Peptide from Sheep Pituitary Glands
 J. Biol. Chem. 239, 1048 (1964)

- 13 BLÜM, V.
Immunologische Untersuchungen an HVL-Hormonen
mit Antikörpern von Säugetieren und Fischen
Acta Endocr. 59, 379 (1968)
- 14 BONSNES, R.W. and A. WHITE
Fractionation of Saline Extracts of
Anterior Pituitary Tissue
Endocrinology 26, 990 (1940)
- 15 BRAGDON, J.H. and R.S. GORDON
Distribution of ^{14}C After the Intravenous
Injection of Labelled Chylomicrons and
Unesterified Fatty Acids in the Rat
J. Clin. Invest. 37, 574 (1958)
- 16 BRODIE, B.B., R.P. MAICKEL and D.N. STERN
Autonomic Nervous System and Adipose Tissue
aus: Handbook of Physiology 5, Adipose Tissue
(ed. A.E. RENOLD und G.F. CAHILL) 1965
- 17 BURN, J.H. and H.W. LING
The Effect of Insulin on Acetonuria
J. Physiol. (Lond.) 65, 191 (1928)
- 18 BURNS, T.W., C.N. HALES and A. STOCKELL-HARTREE
Observations on the Lipolytic Activity of
Human Serum and Pituitary Fractions in vitro
J. Endocr. 39, 213 (1967)

- 19 BURNS, T.W. and P. LANGLEY
 Observations on Lipolysis with Isolated
 Adipose Tissue Cells
 J. Lab. & Clin. Med. 72, 813 (1968)

- 20 BUTCHER, R.W. and E.W. SUTHERLAND
 The Role of Cyclic AMP in the Lipolytic and
 Anti-Lipolytic Actions of Hormones on
 Adipose Tissue
 in: Protein and Polypeptide Hormones I
 (ed. M. MARGOULIS) Intern. Congr.
 Ser.No. 161 , p. 150 (1968)

- 21 CAMPBELL, J., A.D. MARTUCCI and G.R. GREEN
 Plasma Albumin as an Acceptor of Free Fatty
 Acids
 Biochem. J. 92, 183 (1964)

- 22 CHALMERS, T.M., G.L.S. PAWAN and A. KEKWICK
 Fat-Mobilizing and Ketogenic Activity of
 Urine Extracts: Relation to Corticotrophin
 and Growth Hormone
 Lancet 2, 6 (1960)

- 23 CHASSON, A.L., H.J. GRADY and M.A. STANLEY
 Nach Methoden für den Technicon Autoanalyser

- 24 CHRETIEN, M.
 Les Hormones Lipolytiques Hypophysaires
 L'Union Méd. du Canada 97, 1 (1968)

- 25 CHRETIEN, M. and C.H. LI
Isolation, Purification and Characterization
of gamma-Lipotropic Hormone from Sheep
Pituitary Glands
Can. J. Biochem. 45, 1163 (1967)
- 26 CLARK, A.J.
General Pharmacology
in: HEFTER's Handbuch der experimentellen
Pharmakologie, Erg.Werk Bd. 4,
Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer 1937
- 27 CLOTTEN, R. und A. CLOTTEN
Hochspannungselektrophorese, p. 142
Stuttgart, Thieme 1962
- 28 COOPE, R. and E.N. CHAMBERLAIN
The Effect of Pituitin on the Fatty Acid
of the Liver
J. Physiol. (Lond.) 60, 69 (1925)
- 29 CSEH, G. and L. GRAF
Species Characteristics in Lipid Mobilizing
Peptides of Pig Pituitary
Protein and Polypeptide Hormones 2
(ed. M. MARGOULIS) p. 498 (1968)
- 30 CSEH, G., L. GRAF and E. GOTH
Lipotropic Hormone Obtained from Human
Pituitary Gland
Febs Letters 2, 42 (1968)

- 31 DAHME, E.
Das Schwein, ein Versuchstier für die experimentelle
Arterioskleroserecherche
Z. ges. exp. Med. 145, 305 (1968)
- 32 DEBONS, A.F., and I.L. SCHWARTZ
Dependence of the Lipolytic Action of Epinephrine
in vitro upon Thyroid Hormone
J. Lipid Res. 2, 86 (1961)
- 33 DEININGER, R.
Papierchromatographischer Nachweis
der Barbitursäuren
Arzneimittelforschung 5, 472 (1955)
- 34 DI GIROLAMO, M. and D. RUDMAN
Species Differences in Glucose Metabolism
and Insulin Responsiveness of Adipose Tissue
Amer. J. Physiol. 210, 721 (1966)
- 35 DI GIROLAMO, M., D. RUDMAN, M.B. REID and
F. SEIDMAN
Effect of Pituitary Hormones upon Serum
FFA-Concentration of the Rabbit
Endocrinology 68, 457 (1961)
- 36 DITSCHUNEIT, H.
Die hormonelle Regulation von Lipolyse
und Lipogenese des Fettgewebes
Therapiewoche 45, 2015 (1968)

- 37 Documenta Geigy, Ausgabe 1960
- 38 DOERR, H.W.
Inauguraldissertation
im Druck, München 1971
- 39 DOLE, V.P.
A Relation Between Non-esterified Fatty Acids
in Plasma and the Metabolism of Glucose
J. Clin. Invest. 35, 150 (1956)
- 40 DOLE, V.P. and H. MEINERTZ
Microdetermination of Long-chain Fatty Acids
in Plasma and Tissue
J. Biol. Chem. 235, 2595 (1960)
- 41 DOORENBOOS, H., W.D. REITSMA, J. STRACKEE
and A. JANSZ
Effect of Fasting and Food Intake on Serum Growth
Hormone, Free Fatty Acids and Blood Sugar Levels
Acta Endocr. (Kbh.) 89, 14 (1964)
- 42 DORFNER, K.
Ionenaustauscher
Berlin, de Gruyter 1964
- 43 DRUMMOND, G.I. and S. PERROTT- YEE
Enzymatic Hydrolysis of Adenosine 3',5'-Phosphoric
Acid
J. Biol. Chem. 236, 1126 (1961)

- 44 EGGSTEIN, M. und F.H. KREUTZ
Eine neue Bestimmung der Neutralfette im
Blutserum und Gewebe
Klin. Wschr. 44, 262 (1966)
- 45 EICHER, R.
Inauguraldisertation
im Druck, München 1970
- 46 Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie
Firmenvorschrift der Fa. Boskamp, Hersel (1966)
- 47 ELIAS, H.G.
Ultrazentrifugenmethoden
Beckman, München 1961
- 48 ENGEL, F.L. and J.L. KOSTYO
Metabolic Actions of Pituitary Hormones
The Hormones, Physiology, Chemistry and
Applications 5, 69 (1964)
- 49 FATEH-MOGHADAM, A., S. WERNER, R. EICHER und
P. SCHWANDT
Untersuchungen über ein biologisch wirksames
Peptid aus Schweinehypophysen (Fraktion H).
IV. Immunologische Eigenschaften
Z. ges. exp. Med. 149, 226 (1969)
- 50 FEINBERG, J.G.
Quantitative Immuno-Analysis in Gel Plates
Nature (Lond.) 185, 555 (1950)

- 51 FOLIN, O. and V. CIOCALTEU
On Tyrosine and Tryptophane Determinations
in Proteins
J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)
- 52 FREDERICKSON, D.S., R. GORDON, K. ONO and
A. CHERKES
The Metabolism of Albumin Bound ^{14}C Labelled
Unesterified Acids in Normal Human Subjects
J. Clin. Invest. 27, 1504 (1958)
- 53 FREDERICKSON, D.S., K. ONO and L.L. DAVIS
Lipolytic Activity of Postheparin Plasma
in Hyperglyceridemia
J. Lipid Res. 4, 24 (1963)
- 54 FREINKEL, N.
Extra Thyroidal Actions of Pituitary Thyrotropin:
Effects on Carbohydrate, Lipid and Respir atory
Metabolism of Rat Adipose Tissue
J. Clin. Invest. 4, 476 (1961)
- 55 FRIESEN, H., M. IRIE and R.J. BARRETT
An Immunologic Study of Two Metabolically
Active Peptides from the Anterior Pituitary
Gland
J. Exp. Med. 115, 513 (1962)

- 56 GALTON, D.J.
Lipogenesis in Human Adipose Tissue
J. Lipid Res. 9, 19 (1968)
- 57 GILGEN, A., R.P. MAICKEL, O. NIKODIJEVIC
and B.B. BRODIE
Essential Role of Catecholamines in the Mobilization
of Free Fatty Acids and Glucose After Exposure to Cold
Life Sci. 1, 709 (1962)
- 58 GOLDRICK, R.B. and J. HIRSCH
Serial Studies of the Metabolism of Human Adipose
Tissue. II. Effect of Caloric Restriction and
Refeeding on Lipogenesis and the Uptake and Release
of Free Fatty Acids in Obese and Nonobese Individuals
J. Clin. Invest. 43, 1793 (1964)
- 59 GOODMAN, H.M. and G.A. BRAY
Role of Thyroid Hormones in Lipolysis
Am. J. Physiol. 210, 1053 (1966)
- 60 GOODRIDGE, A.G. and E.G. BALL
Lipogenesis in the Pigeon: in vivo Studies
Am. J. Physiol. 213, 245 (1967)
- 61 GORDON, R.S., J. and A. CHERKES
Production of Unesterified Fatty Acids from
Isolated Rat Adipose Tissue Incubated in vitro
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 150 (1958)

- 62 GORDON, R.S., ~~AD~~ CHERKES and H. GATES
Unesterified Fatty Acids in Human Blood Plasma
II. The Transport Function of Unesterified
Fatty Acids
J. Clin. Invest. 36, 810 (1957)
- 63 GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS
Méthode Permettante l'Etude Conjugée des Propriétés
Electrophorétiques et Immunochimiques d'un
Mélange de Protéines. Application au Sérum Sanguin
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 10, 193 (1953)
- 64 GRAF, L. and G. CSEH
Isolation of Porcine beta-Lipotropic Hormone
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 175 (1968)
- 65 GRAF, L., G. CSEH and H. MEDZIHRADSKY-SCHWEIGER
Isolation of gamma-Lipotropic Hormone from
Porcine Pituitary Glands
Biochim. Biophys. Acta 175, 444 (1969)
- 66 HAMOSH, M., P. HAMOSH, J.A. BAR-MAUR and H. COHEN
Fatty Acid Metabolism by Human Adipose Tissue
J. Clin. Invest. 42, 1648 (1963)
- 67 HARLAN, W.R., J. LASZLO, M.D. BOGDONOFF and
E.H.J. ESTES
Alterations in Free Fatty Acid Metabolism in
Endocrine Disorders. I. Effect of Thyroid Hormone
J. Clin. Endocr. 23, 33 (1963)

- 68 HARTMANN, T.
Die Hemmung der lipolytischen Wirkung von Katecholaminen, Polypeptiden und cyclischem 3',5'-Adenosinmonophosphat durch Propanolol und Nikotinsäure in vitro
Inauguraldissertation, München 1969
- 69 HAVEL, R.J. and D.S. FREDERICKSON
The Metabolism of Chylomicra. I. The Removal of Palmitic Acid-1-¹⁴C Labelled Chylomicra from Dog Plasma
J. Clin. Invest. 35, 1025 (1956)
- 70 HIRSCH, J. and R.B. GOLDRICK
Serial Studies on the Metabolism of Human Adipose Tissue. I. Lipogenesis and Free Fatty Acid Uptake and Release in Small Aspirated Samples of Subcutaneous Fat
J. Clin. Invest. 43, 1776 (1964)
- 71 HIRSCH, R.L., D. RUDMAN, R. IRELAND and R.K. SKRALY
Movement of Free Fatty Acids into and out of the Blood Stream in Normal Rabbits and in Rabbits Injected Subcutaneously with the Pituitary Adipokinetic Substances, Fraction H and Adrenocorticotropin
J. Lipid Res. 4, 289 (1963)
- 72 HIRSCH, R.L., D. RUDMAN and R. TRAVERS
Movement of Lipids into and out of the Blood During Hyperlipidemia Induced in Rabbits by Pituitary Extract and Fraction H
J. Lipid Res. 7, 182 (1966)

- 73 HOLLENBERG, C.H., M.S. RABEN and E.B. ASTWOOD
The Lipolytic Response to Corticotropin
Endocrinology 68, 589 (1961)
- 74 ISITSCHENKO, N.A.
Gasaustausch bei fettleibigen Tiere bei Gabe des
Hypophysenpräparates Adiposin (russisch)
Probl. Endocr. u. Hormontherap. (Moskau) 9, 39 (1963)
- 75 ITAYA, K. and M. UI
A New Micromethod for the Colorimetric Determination
of Inorganic Phosphate
Clin. Chim. Acta 14, 361 (1966)
- 76 JAHNKE, K. und F.A. GRIES
Endokrine Regulation des Fettstoffwechsels
Medizin und Ernährung, 6. Jhrg., 4 (1965)
- 77 JANSSEN, G.R., M.E. ZANETTI and C.F. HUTCHKISON
Studies on Lipogenesis in vivo
Biochem. J. 101, 811 (1966)
- 78 JEANRENAUD, B. and A.E. RENOLD
Studies in Rat Adipose Tissue in vitro,
VII. Effects of Adrenal Cortical Hormones
J. Biol. Chem. 235, 1117 (1960)
- 79 KELLNER, A., R.L. HIRSCH and E.B. FREEMAN
Inhibition of Lipoprotein Lipase Activity Following
Injection of Pituitary Extracts into Rabbits
J. Exp. Med. 93, 373 (1951)

- 80 KNEDEL, M. und A. FATEH-MOGHADAM
Methoden und Ergebnisse der Säulenchromatographie
in der klinischen Proteinchemie
Ergebn. Labor. Med. 2, 137 (1963)
- 81 KNEDEL, M. und F. SPERL
Über ein präparatives Elektrophorese-Verfahren
mit Kartonpapier als Trägermaterial
Blut, Zeitschrift für die gesamte Blutforschung V,
Heft 2, 65 (1959)
- 82 KRONE, W.
Inauguraldissertation
im Druck, München 1971
- 83 KREUTZ, F.H.
Nach Methoden für den Technicon Autoanalyser
- 84 LANDOLT, R. und E.B. ASTWOOD
Fat Mobilization and Hyperlipemia from
Pituitary Extracts in Rabbits
Am. J. Physiol. 200, 841 (1961)
- 85 LARON, Z. and A. KOWADLO-SILBERGELD
Fat-mobilizing Effect of Testosterone
Metabolism 12, 588 (1963)
- 86 LAURELL, S.
Turnover Rate of Unesterified Fatty Acids of
Human Plasma
Acta Physiol. Scand. 41, 158 (1957)

- 87 LEITES, S.M., A.A. MOLTSCHANOWA und T.S. JAKUSCHEWA
Der Einfluß eines Hypophysenpräparates auf einige
Seiten des Fettstoffwechsels (russisch)
Probl. Endocr. u. Hormontherap. (Moskau) 2, 49 (1956)
- 88 LELEK, J., D. NAGY, L. KADAS und L. VIRAY
Lipidmobilisierendes Hormon beim Menschen
Endokrinologie 41, 337 (1961)
- 89 LEVY, A.C. and E.R. RAMEY
The Effect of Adrenal Steroids in Peripheral
Fat Mobilization in the Rat
Endocrinology 64, 586 (1959)
- 90 LI, C.H., L. BARNAFI, M. CHRETIEN and D. CHUNG
Isolation and Structure of beta-LPH from
Sheep Pituitary Glands
Excerpta Med. Intern. Congr. 112, 349 (1966)
- 91 LOHMAR, P. and C.H. LI
Isolation of Bovine beta-Lipotropic Hormone
Biochim. Biophys. Acta 147, 381 (1967)
- 92 LOHMAR, P. and C.H. LI
Biological Properties of Ovine beta-Lipotropic
Hormone
Endocrinology 82, 898 (1968)
- 93 LOWRY, O.H., N.R. ROSEBROUGH, A.L. FARR
and R.J. RANDALL
Protein Measurement with the FOLIN Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

- 94 LYDTIN, H., M. PIEPER, T. KUSUS, K. SCHNELLE
und N. ZÖLLNER
Die Implantation von Verweilkathetern in die
Vena portae, die Vena cava, den rechten Vorhof
und in den Magen des Miniaturschweines
Z. ges. exp. Med. 149, 279 (1969)
- 95 MAGISTRIS, H.
Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysen=
vorderlappens
Endokrinologie 11, 176 (1932)
- 96 MARSCH, W.H., B. FINGERHUT and E. KIRSCH
Determination of Urea Nitrogen with the Diacetyl
Method and an Automatic Dialyzing Apparatus
Amer. J. Clin. Pathol. 28, 681 (1957)
- 97 MAURER, H.R.
Disk-Elektrophorese - Theorie und Praxis der
diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese
De Gruyter, Berlin 1968
- 98 McLEAN, P., J. BROWN and A.L. GREENBAUM
Hormonal Control of Carbohydrate Metabolism
of Adipose Tissue
in: Carbohydrate Metabolism and Its Disorders
(ed. F. DICKENS, P.J. RANDLE and W.J. WHELAN)
Academic Press, London-New York, 1, 397 (1968)
- 99 MOSINGER, B., E. KUHN and V. KUJALOVA
Action of Adipokinetic Hormones on Human
Adipose Tissue in vitro
J. Lab. & Clin. Med. 66, 380 (1965)

- 100 MÜLLER-OERLINHAUSEN, B., U. SCHWABE,
A. HASSELBLATT and F.J. SCHMIDT
Activity of 3',5'-AMP Phosphodiesterase in Liver
and Adipose Tissue of Normal and Diabetic Rats
Life Sciences 7, 593 (1968)
- 101 MYANT, N.B.
The Thyroid and Lipid Metabolism
in: Lipid Pharmacology, p. 299 (ed. R. PAOLETTI)
Academic Press, London-New York 1964
- 102 NAYAK, R.V., E. BOSSAK-FELDMAN and A.C. CARTER
Adipokinetic Effect of Intravenous Cortisol
in Human Subjects
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 111, 682 (1962)
- 103 NORDMANN, R., O. GAUCHERY, J.P. DU RUISSEAU,
J. THOMAS et J. NORDMANN
Chromatographie sur Papier des Acides Organiques
Non Volatils des Liquides Biologiques. II. Le
Chromatogramme Qualitatif de l'Urine Humaine Normale
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 1641 (1954)
- 104 NORMAN, N. and A. TURTER
Radioimmunoassay Studies with Human Growth Hormone
and a Pituitary Lipid Mobilizing Factor
Acta Endocr. (Kbh.) 58, 318 (1968)
- 105 OLENEWA, W.A.
Adiposin in der komplexen Therapie der Fettsucht
(russisch)
Therapeut. Archiv (Moskau) 40, 104 (1968)

- 106 OUCHTERLONY, Ö.
Antigen-Antibody-Reactions in Gels
Ark. kemi B 26, 1 (1948)
- 107 OUCHTERLONY, Ö.
Diffusion in Gel, Methods for Immunological Analysis II
Progr. Allergy 6, 30 (1962)
- 108 PAOLETTI, R., R.L. SMITH, R.P. MAICKEL and
B.B. BRODIE
Identification and Physiological Role of
Norepinephrine in Adipose Tissue
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 424 (1961)
- 109 PASCASIO, F.M. and H.A. SELENKOW
Immunologic and Biologic Properties of
Thyrotropin Antiserums
Endocrinology 71, 254 (1962)
- 110 PATAKI, G.
Dünnschichtchromatographie in der Aminosäuren-
und Peptidchemie
De Gruyter, Berlin 1966
- 111 PAYNE, R.W.
Studies on the Fat-Mobilizing Factor of the
Anterior Pituitary Gland
Endocrinology 45, 305 (1949)

- 112 PFLEIDERER, G., P.G. CELLIERS, M. STANULOVIC,
E.D. WACHSMUTH, H. DETERMAN und G. BRAUNITZER
Eigenschaften und analytische Anwendungen der
Amino-peptidase aus Nierenpartikeln
Biochem. Z. 340, 552 (1964)
- 113 PORATH, J.
Gel Filtration of Proteins, Peptides and Amino Acids
Biochim. Biophys. Acta 39, 193 (1960)
- 114 PORATH, J. and B. GELOTTE
in: E. HEFTMANN (ed.), Methods of Chromatography,
p. 343, Reinhold, New York 1966
- 115 RABEN, M.S., R. LANDOLET, E.A. SMITH, K. HOFFMANN
and H. YAJIMA
Adipokinetic Activity of Synthetic Peptides
Related to Corticotropin
Nature (Lond.) 189, 681 (1961)
- 116 RALL, T.W., E.W. SUTHERLAND and J. BERTHET
The Relationship of Epinephrine and Glucagon to
Liver Phosphorylase. IV. Effect of Epinephrine and
Glucagon on the Reactivation of Phosphorylase
in Liver Homogenates
J. Biol. Chem. 224, 463 (1957)
- 117 REISFELD, R.A., U.J. LEWIS and D.E. WILLIAMS
Disc Electrophoresis of Basic Proteins and
Peptides on Polyacrylamide Gels
Nature (Lond.) 195, 281 (1962)

- 118 RIZACK, M.A.
An Epinephrine-Sensitive Lipolytic Activity
in Adipose Tissue
J. Biol. Chem. 236, 657 (1961)
- 119 RIZACK, M.A.
Activation of an Epinephrine-Sensitive Lipolytic
Activity from Adipose Tissue by Adenosine-3',5'-Phosphat
J. Biol. Chem. 239, 392 (1964)
- 120 ROOS, P., H.R. FEVOLD and C.A. GEMZELL
Preparation of Human Growth Hormone by Gel Filtration
Biochim. Biophys. Acta 74, 525 (1963)
- 121 ROSS, B.D., R. HEMS, R.A. FREEDLAND and H.A. KREBS
Carbohydrate Metabolism of the Perfused Rat Liver
Biochem. J. 105, 869 (1967)
- 122 RUDMAN, D.
Lipemia in the Rabbit Following Injection of
Pituitary Extract
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99, 146 (1958)
- 123 RUDMAN, D.
The Adipokinetic Action of Polypeptide and Amine
Hormones Upon the Adipose Tissue of Various
Animal Species
J. Lipid Res. 4, 119 (1963)
- 124 RUDMAN, D.
The Adipokinetic Property of Hypophyseal Peptides
Erg. Physiol. 56, 297 (1965)

- 125 RUDMAN, D. and A.E. DEL RIO
Responsiveness to Lipolytic Hormones, and Inactivation
of Adrenocorticotropin, by Adipose Tissue Slices
and Free Fat Cells from Different Mammalian Species
Endocrinology 85, 209 (1969)
- 126 RUDMAN, D., A.E. DEL RIO, L.A. GARCIA, J. BARNETT,
C.H. HOWARD, W. WALKER and G. MOORE
Isolation of Two Lipolytic Pituitary Peptides
Biochem. J. 2, 99 (1970)
- 127 RUDMAN, D., M. DI GIROLAMO, F.E. KENDALL, A.E. WERT-
HEIM, F. SEIDMAN, M.B. REID and S. BERN
Further Observations on the Effect of Pituitary
Gland Extracts Upon the Serum Lipid of the Rabbit
Endocrinology 67, 784 (1960)
- 128 RUDMAN, D., M. DI GIROLAMO, M.F. MALKIN
and L.A. GARCIA
The Adipokinetic Property of Hypophyseal Peptides and
Catecholamines: A Problem in Comparative Endocrinology
in: Handbook of Physiology 5, Adipose Tissue
(ed. A.E. RENOLD and G.F. CAHILL) 1965
- 129 RUDMAN, D. and M. DI GIROLAMO
Comparative Studies on the Physiology of Adipose
Tissue
Adv. Lipid Res. 5, 35 (1967)
- 130 RUDMAN, D., R.L. HIRSCH, F.E. KENDALL, F. SEIDMAN
and S.J. BROWN
An Adipokinetic Component of the Pituitary Gland:
Purification, Physical, Chemical and Biological
Properties
Recent Progr. in Hormone Research 18, 89 (1962)

- 131 RUDMAN, D., M.B. REID, F. SEIDMAN, M. DI GIROLAMO,
A.R. WERTHEIM and S. BERN
Purification and Properties of a Component of the
Pituitary Gland which Produces Lipemia in the Rabbit
Endocrinology 68, 273 (1961)
- 132 RUDMAN, D., F. SEIDMAN and M.B. REID
Lipemia-Producing Activity of Pituitary Gland:
Separation of Lipemia-Producing Component from Other
Pituitary Hormones
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 103, 315 (1960)
- 133 RUDMAN, D., F. SEIDMAN, S.J. BROWN and R.L. HIRSCH
Adipokinetic Activity of Porcine Fraction H in
the Rabbit, Guinea Pig, Rat and Mouse
Endocrinology 70, 233 (1962)
- 134 RYSCHKA, F.J. und A.S. CHOCHLOW
Reinigung und Studium des Lipotropins aus Hypophysen
verschiedener Spezies (russisch)
Biochimija (Moskau) 30, 1277 (1965)
- 135 SANFELIPPO, P.M. and J.G. SURAK
The Behaviour of Hormonally Active Proteins and
Peptides of the Anterior Pituitary on Cross-Linked
Dextran Polymer Gels
J. Chromatog. 13, 148 (1964)
- 136 SAYERS, M.A., G. SAYERS and L.A. WOODBURY
Endocrinology 42, 379 (1948)
- 137 SCHEIDEGGER, J.J.
Une Micro-Méthode de l'Immuno-électrophorèse
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

- 138 SCHIMASSEK, W.
Hormonwirkungen an isoliert durchströmten Organen
in: Wirkungsmechanismen der Hormone (ed. P.KARLSON)
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967
- 139 SCHOTZ, M.C. and I.H. PAYER
Effect of Adrenergic Blocking Agents on the
Release of Free Fatty Acids from Rat Adipose Tissue
J. Lipid Res. 1, 466 (1960)
- 140 SCHWANDT, P.
Über die hypophysäre Regulation des Fettstoffwechsels
Int. J. clin. Pharmacol., Beiheft Fettstoffwechsel
1969, p. 57
- 141 SCHWANDT, P., H.J. KARL, J. THÜNER und M. KNEDEL
Untersuchungen über eine lipolytisch wirksame Sub-
stanz aus Schweinehypophysen (Fraktion H).
Extraktion und Reinigung der lipolytischen Fraktion
Z. ges. exp. Med. 147, 246 (1968)
- 142 SCHWANDT, P., M. KNEDEL und R. LINDLBAUER
Experimentelle Untersuchungen zum Verfahren der
in vitro-Lipolyse
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 2, 81 (1968)
- 143 SCHWANDT, P., WERNER. und H.J. KARL
Untersuchungen über ein biologisch wirksames Peptid
aus Schweinehypophysen (Fraktion H). III. Wirkung
auf Enzymaktivitäten in Leber und Fettgewebe
Z. ges. exp. Med. 149, 139 (1969)

- 144 SEIFTER, J. and D.H. BAEDER
Occurrence in Plasma of an Extractable Lipid
Mobilizer (LM)
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 91, 42 (1956)
- 145 SEIFTER, J. and D.H. BAEDER
Lipid Mobilization by a Crystalline Peptide
Isolated from Plasma of Horse Administered Cortisone
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 95, 469 (1957)
- 146 SENFT, G.
Hormonal Control of Carbohydrate and Lipid
Metabolism and Drug Induced Alterations
Nauneyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 259,
117 (1968)
- 147 SEUBERT, W.
Cortisol als Enzyminduktor mit besonderer
Berücksichtigung der Glucoseogenese
in: Wirkungsmechanismen der Hormone (ed. P. KARLSON)
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1967
- 148 SHAFRIR, E. and D. STEINBERG
The Essential Role of Adrenal Cortex in the Response
of Free Fatty Acids, Cholesterol and Phospholipids
to Epinephrine Injection
J. Clin. Invest. 39, 310 (1960)
- 149 SHRAGO, E., T. SPENNETTA and E. GORDON
Acid Synthesis in Human Adipose Tissue
J. Biol. Chem. 244, 2761 (1969)

- 150 SKEGGS, L.T.
An Automatic Method for Colorimetric Analysis
Amer. J. Clin. Pathol. 28, 311 (1957)
- 151 SOBER, H.A. and E.A. PETERSON
Protein Chromatography on Ion Exchange Cellulose
Federation Proceedings 17, 1116 (1958)
- 152 SPACKMAN, D.H., W.H. STEIN and S. MOORE
Automatic Recording Apparatus for Use in the
Chromatography of Amino Acids
Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
- 153 SPERRY, W.M. and M. WEBB
A Revision of the SCHOENHEIMER-SPERRY Method
for Cholesterol Determination
J. Biol. Chem. 187, 97 (1950)
- 154 STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie. IV. Mitteilung:
Einsatzschema, Randeffect, saure und basische
Schichten, Stufentechnik
Pharmazie 222, 411 (1959)
- 155 STEINBERG, D., E. SHAFRIR and M. VAUGHAN
Direct Effect of Glucagon on Release of Unesterified
Fatty Acids (UFA) from Adipose Tissue
Clin. Res. Proc. 8, 250 (1959)
- 156 STETTIN jr., D.
Relationship of Hormone Dosage to Physiological
Response
Science 124, 365 (1956)

- 157 STEVENS, D.L. and L.T. SKEGGS
Nach Methoden für den Technicon Autoanalyser
- 158 STOCK, K. und E. WESTERMANN
Hemmung der Lipolyse durch alpha- und beta-Sympathicolytica, Nicotinsäure und Prostaglandin E₁
Nauneyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 254, 334 (1966)
- 159 STRAND, O., M. VAUGHAN and D. STEINBERG
Rat Adipose Tissue Lipases: Hormone Sensitive Lipase Activity Against Triglycerides Compared with Activity Against Lower Glycerides
J. Lipid Res. 5, 554 (1964)
- 160 STRAUB, K., M. SCHLEYER, R. FUSSGÄNGER, J.D. FAULHABER, K.H. VOGT, A. ESPINOZA und E.F. PFEIFER
Biologische Eigenschaften einer adipokinetischen Hypophysenfraktion
4. Kongreß der dtsh. Diabetes-Ges., Ulm 17, 95 (1969)
- 161 SUTHERLAND, E.W., R.W. BUTCHER, G.A. ROBISON and J.G. HARDMAN
The Role of Adenosine-3',5'-monophosphate in Hormone Action
in: Wirkungsmechanismen der Hormone (ed. P. KARLSON)
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1967
- 162 SUTHERLAND, E.W. and T.W. RALL
Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles
J. Biol. Chem. 232, 1077 (1958)

- 163 SUTHERLAND, E.W. and T.W. RALL
The Properties of an Adenine Ribonucleotide
Produced with Cellular Particles, ATP, Mg^{2+}
and Epinephrine or Glucagon
J. Am. Chem. Soc. 79, 3608 (1957)
- 164 SUTHERLAND, E.W. and T.W. RALL
The Relation of Adenosine-3',5'-Phosphate and
Phosphorylase to the Actions of Catecholamines
and Other Hormones
Pharmacol. Rev. 12, 265 (1960)
- 165 SUTHERLAND, E.W. and A. ROBISON
The Role of Cyclic 3',5'-AMP in Responses to
Catecholamines and Other Hormones
Pharmacol. Rev. 18, 145 (1966)
- 166 SUTHERLAND, E.W., G.A. ROBISON and R.W. BUTCHER
Some Aspects of the Biological Role of Adenosine-
3',5'-Monophosphate (Cyclic AMP)
Circulation XXXVII, 279 (1968)
- 167 TAMASI, G., G. CSEH and L. GRAF
Effects of Porcine beta-Lipotropic Hormone on
Lipid Metabolism
Separatum Experimentia 25, 360 (1969)
- 168 TANAKA, A.B., T. PICKERING and C.H. LI
Relationship of Chemical Structure to in vitro
Lipolytic Activity of Peptides Occuring in
Adrenocorticotropic and Melanocyte-stimulating
Hormones
Arch. Biochem. 99, 294 (1962)

169 THÜNER, H.J.

Extraktion, Charakterisierung und weitere Reinigung
eines lipidmobilisierenden Peptids (Fraktion II)
aus Schweinehypophysen

Inauguraldissertation, München 1968

170 TRYGSTAD, O.

The Lipid Mobilizing Effect of Some Pituitary
Gland Preparations. I. Evidence for a Lipotropic
Contamination with Rabbit Serum Calcium-Lowering
Effect in Adrenocorticotrophin and Human Growth
Hormone Preparations

Acta Endocr. (Kbh.) 56, 626 (1967)

171 TRYGSTAD, O.

The Lipid Mobilizing Effect of Some Pituitary
Gland Preparations. II. Preparation of a Human
Pituitary Lipid Mobilizing Factor (LMF) with
Hypocalcaemic and Hyperglycaemic Effects in Rabbits

Acta Endocr. (Kbh.) 57, 81 (1968)

172 TRYGSTAD, O.

The Lipid Mobilizing Effect of Some Pituitary
Gland Preparations. III. A Purified Human Pituitary
Lipid Mobilizing Factor (LMF) with Hyperglycaemic
Activity

Acta Endocr. (Kbh.) 58, 277 (1968)

173 TRYGSTAD, O. and I. FOSS

The Lipid Mobilizing Effect of Some Pituitary
Gland Preparations. IV. Subdivision of a Human
Growth Hormone Preparation into a Somatotrophic
and an Adipokinetic-Hyperglycaemic Agent

Acta Endocr. (Kbh.) 58, 295 (1968)

- 174 VAUGHAN, M., E. BERGER and D. STEINBERG
Hormone Sensitive Lipase Activities in Adipose Tissue
J. Biol. Chem. 239, 401 (1964)
- 175 VAUGHAN, M. and D. STEINBERG
Effect of Hormones on Lipolysis and Esterfication of Free Fatty Acids During Incubation of Adipose Tissue in Vitro
J. Lipid Res. 4, 193 (1963)
- 176 WEICHSELBAUM, T.E.
Biuretmethod mit Photometer "Eppendorf"
Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sect.) 10, 40 (1946)
- 177 WEIL, R.
Pituitary Growth Hormone and Intermediary Metabolism
I. The Hormonal Effect on the Metabolism of Fat and Carbohydrate
Acta Endocr. (Kbh.) Suppl. 98 (1965)
- 178 WEIL, R. and D. STETTEN
The Urinary Excretion of a Fat-Mobilizing Agent
J. Biol. Chem. 168, 129 (1947)
- 179 WEINGES, K.F.
Fettsäure- und Glucosestoffwechsel am Fettgewebe unter den Bedingungen der hormonsensitiven Lipase
11. Symp. d. dtsh. Ges. f. Endokrinologie, p. 174 (1966)
- 180 WEINGES, K.F. und G. LÖFFLER
Wirkungsmechanismus und Stoffwechseleffekte von Glukagon und Nebennierenmarkhormonen
in: Handbuch des Diabetes mellitus, Band I (ed. E.F. PFEIFER), Lehmann, München 1969

- 181 WERNER, S.
Untersuchungen über biologische Wirkungen eines
lipolytisch wirksamen Peptids aus Schweinehypo-
physen (Fraktion II)
Inauguraldissertation, München 1969
- 182 WESTERMANN, E.
Mechanismus und pharmakologische Beeinflussung
der endokrinen Lipolyse
11. Symp. d. dtsh. Ges. f. Endokrinologie, p. 154
(1966)
- 183 WESTERMANN, E. und K. STOCK
Stimulierung der Lipolyse durch Hypophysenhormone
Med. u. Ernährung 7, 153 (1967)
- 184 WHITE, J.E. and F.L. ENGEL
A Lipolytic Action of Epinephrine and Norepinephrine
on Rat Adipose Tissue in vitro
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 92, 375 (1958)
- 185 WIELAND, T. and E. KAWERAU
Conservation of Amino Acid Chromatograms
Nature (Lond.) 168, 77 (1951)
- 186 WIELAND, O. and O. WEISS
Increase in Liver Acetyl-Coenzyme A During Ketosis
Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 333 (1963)
- 187 YPHANTIS, G.A.
Rapid Determination of Molecular Weight of
Peptides and Proteins
Amer. N. Y. Acad. Sci. 88, 586 (1960)

Lebenslauf

Als Sohn des Versicherungsdirektors Jakob Weisweiler und seiner Ehefrau Helga, geb. Schweinsberg am 8. 2. 1945 in Jerxheim geboren, besuchte ich nach der Volksschule 1 Jahr das Hamburger Christianeum und 8 Jahre die Kieler Gelehrtenschule, wo ich 1964 das Reifezeugnis erwarb.

Nach zweijähriger Bundeswehrdienstzeit begann ich 1966 das Studium der Medizin in Kiel.

Nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung 1967 und der ärztlichen Vorprüfung 1968 in Kiel setzte ich das Studium in München fort. Im Dezember 1971 habe ich das Staatsexamen vollständig bestanden.

